

บทที่ 3

การทดสอบฤทธิ์ของซีรีซินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวใหญ่ สายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 120 – 160 g (จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา) แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว (รูปที่ 16) โดยแบ่งทำการทดลอง 2 ครั้ง กลุ่มละ 3 ตัว ทำการเลี้ยงหนูเพื่อปรับสภาพสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และมีความชื้นประมาณ $50 \pm 10\%$ และควบคุมการปิด-เปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงอย่างสม่ำเสมอ ทำการเลี้ยงหนูทดลองด้วยอาหารที่มีซีรีซิน (4% sericin) หรือเคซีน (4% casein) ซึ่งเป็นอาหารกลุ่มควบคุม

2. การเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่

ทำได้โดยการฉีดหนูทดลองด้วย 1,2- Dimethylhydrazine (DMH) ขนาด 20 mg/kg (ละลายใน 1mM EDTA, pH 6.5) เข้าใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 16) หลังจากนั้นอีก 10 สัปดาห์ ทำการผ่าตัดหนูเพื่อทำการเก็บตัวอย่างลำไส้ใหญ่และนำไปตรวจสอบการเกิดมะเร็ง

3. การตรวจสอบการเกิด Aberrant Crypt Foci (ACF)

ตัดส่วนของลำไส้ใหญ่ออกจากหนูและแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้นที่ต่อมาจากลำไส้เล็ก (proximal) ส่วนที่อยู่ถัดมาประมาณกึ่งกลางลำไส้ใหญ่ (middle) และส่วนสุดท้ายที่ติดกับส่วนของลำไส้ตรง (distal) นำทุกส่วนมาตรวจหา ACF (Aberrant Crypt Foci) ซึ่งเป็น marker หรือจุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยนำลำไส้ทั้ง 3 ส่วนมาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แล้วนำแต่ละส่วนมาตัดแบ่งอีกเป็น 3 ส่วนย่อย เพื่อแบ่งไปตรวจสอบการเกิด ACF, การเกิด lipid peroxidation และทำการย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry ต่อไป ในการตรวจสอบ marker ของการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ ทำโดยตัดลำไส้ใหญ่ตามความยาวของลำไส้จากนั้นจึงแผ่ออกและนำไปวางบนแผ่นกระดาษ เพื่อ fix ด้วย neutral formalin buffer ประมาณ 6 ชั่วโมงจึงนำมาย้อมด้วย 0.2% methylene blue ประมาณ 5 นาที เพื่อบันทึกจำนวน ACF ที่เกิดขึ้นภายใต้กล้อง stereo microscope, จำนวน aberrant crypts ในแต่ละ ACF (crypt multiplicity) และประเมินความรุนแรงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการนับจำนวน aberrant crypts ที่พบในแต่ละ focus โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะของ aberrant crypts ที่พบ คือ 1, 2, 3, 4 และ ≥ 5 aberrant crypts ต่อ focus

4. การเกิด lipid peroxidation

ในการตรวจสอบการเกิด lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง ทำโดยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay ซึ่งมีวิธีการสรุปโดยย่อ ดังนี้ นำลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองมาบดด้วย PBS buffer ที่มีการเติม 1mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) จากนั้นจึงทำการเติม TBARs reagent (40% TCA: 1.4% TBA: 8% HCl) และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาอ่านค่า fluorescent intensity ที่ความยาวคลื่น Ex. 535 nm และ Em. 595 nm ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการคำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้จากการบดลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองด้วยชุด BCA protein assay kit (Pierce) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการเกิด lipid peroxidation ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน

5. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในลำไส้ใหญ่ด้วยวิธี immunohistochemistry

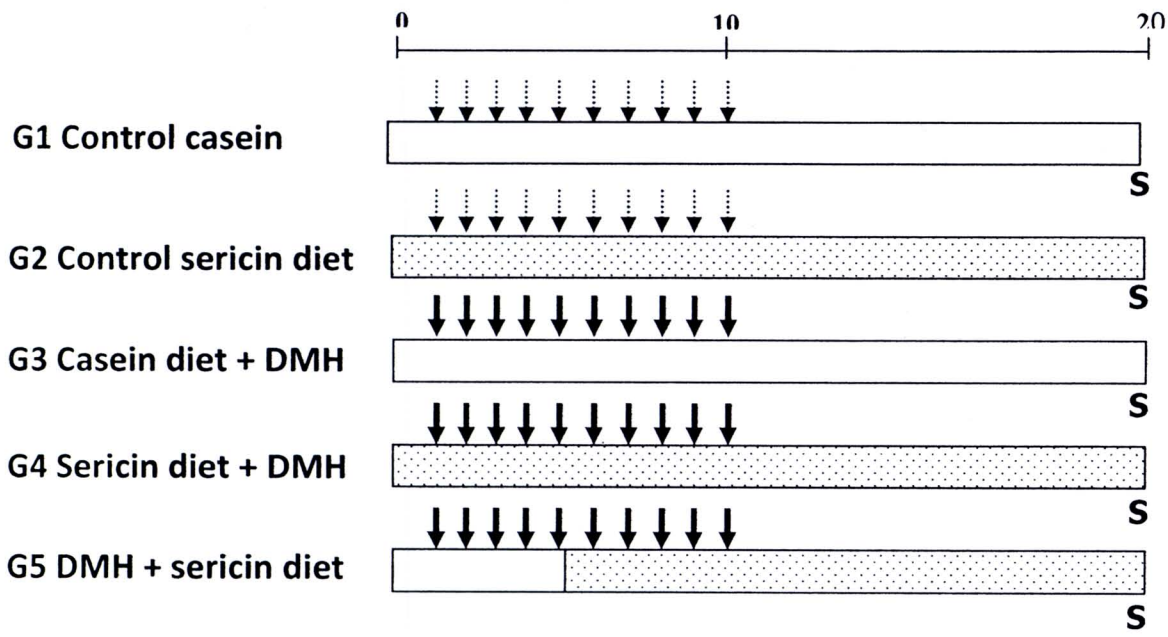
หลังจากทำการเก็บชิ้นเนื้อของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองใน 10% neutral formalin buffer จากนั้นจะนำชิ้นเนื้อมา process ด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ หลังจากผ่านการ process แล้วจะนำชิ้นเนื้อมาหล่อด้วยพาราฟิน (paraffin embedding) เพื่อให้เป็นบล็อกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงนำมาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบอัตโนมัติ (microtome) ความหนา 3 µm ซึ่งก่อนที่จะนำสไลด์ที่ตัดได้มาตรวจสอบด้วย marker ทั้งสองชนิด จะต้องดูสภาพทาง morphology ของลำไส้ใหญ่ก่อนทุกครั้ง ซึ่งทำได้โดยการย้อมสไลด์ด้วย Hematoxylin & Eosin (H&E) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน Ki67 และ Bcl-2 ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ระบบ Avidin-Biotin complex system (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการลอกพาราฟิน (deparaffinization) ออกจากชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่บนสไลด์ ด้วย xylene จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (dehydration) โดยการใช้แอลกอฮอล์ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่างๆ กัน และป้องกันการเกิด non specific binding โดยการ block ด้วย 0.5% H₂O₂ จากนั้นจึงทำ antigen retrieval ด้วยการต้มใน citrate buffer pH 6.0 เป็นเวลา 10 นาที จึงนำสไลด์มาเติม anti-Ki67 และ anti-Bcl-2 (Abcam) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Ki67 และ Bcl-2 ใช้ dilution 1:150 และ 1: 200 ตามลำดับ) จากนั้นจึงเติม biotinylated secondary antibody ประมาณ 30 นาที และเติม diaminobenzidine (DAB) substrate และย้อม counterstain ด้วย Hematoxylin อีกครั้ง การประเมินการเปลี่ยนแปลงทำได้โดยการนับจำนวนการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของเซลล์และตำแหน่งการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในแต่ละ crypt ของแต่ละกลุ่ม เป็นจำนวนทั้งหมด 60 crypts จาก 2-3 สไลด์ ส่วนการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 จะประเมินจากรูปแบบของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในแต่ละ crypt ของแต่ละกลุ่ม

6. การวัดผลของชิริซินต่อระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับการศึกษาทางด้านระบบภูมิคุ้มกันจะตรวจสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ surface markers (CD markers) ที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ดังนี้ CD2, CD3, CD4, CD8a, CD11a, CD25, CD45, CD54, CD80, CD86 และ RT1B โดยใช้วิธีการย้อมจากเลือดของหนูทดลองที่ทำการเก็บเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) ในวันที่ทำการการุณยฆาตโดยตรง แล้วทำการกำจัดเม็ดเลือดแดงโดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออก จากนั้นจึงนำเซลล์เม็ดเลือดขาวไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometer

7. การคำนวณทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความแปรปรวน (standard deviation, SD) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) และ student T-test ข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p < 0.05$



หมายเหตุ

G1 Control casein diet : กินอาหารที่มี 4% casein

G2 Control sericin diet : กินอาหารที่มี 4% sericin

G3 casein + DMH : กินอาหารที่มี 4% casein และฉีด DMH 20 mg/kg ได้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์

G4 sericin + DMH : กินอาหารที่มี 4% sericin และฉีด DMH 20 mg/kg ได้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์

G5 casein + DMH + sericin : กินอาหารที่มี 4% casein และฉีด DMH 20 mg/kg ได้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 5 หลังฉีด DMH จะเปลี่ยนเป็นอาหารที่มี 4% sericin

S : Sacrifice

⋮ : S.C. injection of 1 mM EDTA pH 6.5 (vehicle)

↓ : S.C. injection of DMH 20 mg/kg b.w.

รูปที่ 16 แผนการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และการให้อาหารซีรีซินกับหนูทดลอง

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเบื้องต้น (preliminary experiment) พบว่า ขนาด (dose) ของ 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 20 mg/kg. body weight สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด ACF ที่ผนังลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้ ซึ่ง ACF นี้เป็น marker หรือจุดเริ่มต้นของการที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป โดยทำการทดลองกับหนู 3 ตัวและหนูทั้งหมดรอดชีวิตจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (ประมาณ 6 เดือน) เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการเลือกใช้ model นี้จึงได้ทำการทดลองเบื้องต้นอีกครั้งกับหนูทดลองอีก 3 ตัว พบว่า ในการทดลองครั้งนี้ มีหนูทดลองบางตัวที่มีน้ำหนักตัวลดลง และกินอาหารน้อยลงเมื่อเลี้ยงจนใกล้สิ้นสุดการทดลอง จึงได้ปรับระยะเวลาในการทดลองเป็น 5 เดือน และพบว่า หนูทดลองยังคงมีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และไม่มีอาการน้ำหนักลด และยังสามารถกินอาหารได้ตามปกติ จึงได้เลือกใช้ระยะเวลาในการสิ้นสุดการทดลองที่ 5 เดือน เป็น model สำหรับหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ตามแผนการดำเนินการดังรูปที่ 16

1. ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกิน

จากการสังเกตเบื้องต้นเกี่ยวกับน้ำหนักของหนูและปริมาณการกินอาหารของหนูทดลอง พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทั้ง 5 กลุ่ม มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 17) ส่วนปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยของหนูในแต่ละกลุ่มในช่วงระยะเวลา 4 เดือนแรกของการทดลอง (รูปที่ 18) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เดือนที่ 5 ของการทดลอง (รูปที่ 18) พบว่าปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยของหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย DMH (กลุ่มที่ 3, 4 และ 5) มีปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ DMH (กลุ่มที่ 1 และ 2) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและและปริมาณการกินอาหารของหนูทดลอง

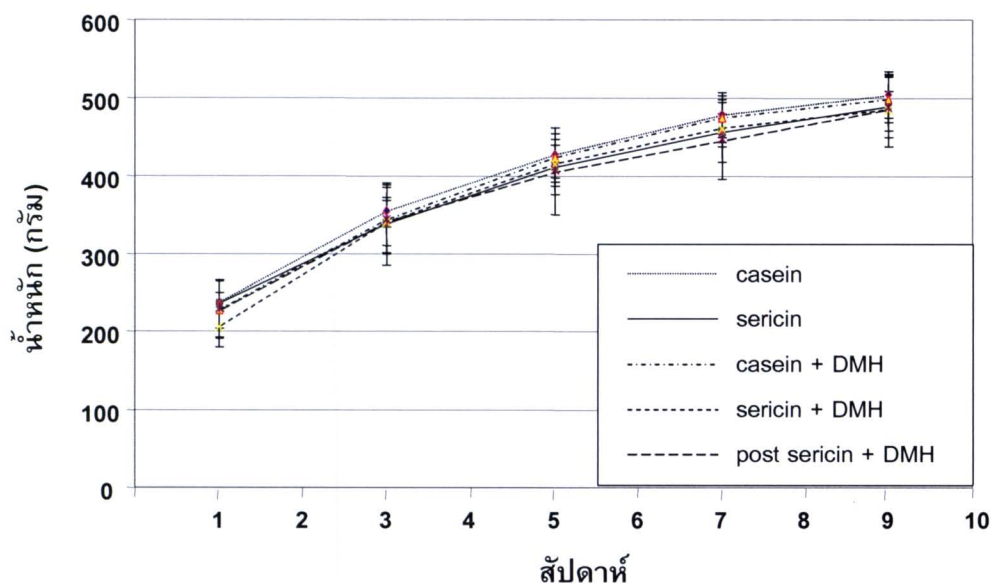
2. ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อน้ำหนักอวัยวะของหนูทดลอง

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง 5 เดือน ได้ทำการผ่าตัดเก็บอวัยวะส่วนต่างๆของหนูทดลองทุกกลุ่ม และทำการชั่งน้ำหนักของอวัยวะต่างๆ ในส่วนของน้ำหนักเฉลี่ยของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม พบว่า มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน รวมทั้งน้ำหนักของลำไส้เล็ก หัวใจ ไต และม้าม ของหนูแต่ละกลุ่มก็มีน้ำหนักไม่แตกต่างกันเช่นกัน (รูปที่ 19) แต่ในส่วนของตับ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของตับหนูในกลุ่มที่ 4 ที่กินอาหารที่มี 4% sericin และได้รับ DMH 20 mg/kg มีน้ำหนักที่น้อยกว่าหนูในกลุ่มควบคุมเล็กน้อย (กินอาหารที่มี 4% casein) แม้จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากความแปรปรวนของหนูกลุ่มนี้ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งความแตกต่างที่พบมีค่าไม่มากนัก และอาจไม่มีนัยสำคัญทางคลินิก

3. ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อเอนไซม์ในเลือดของหนูทดลอง

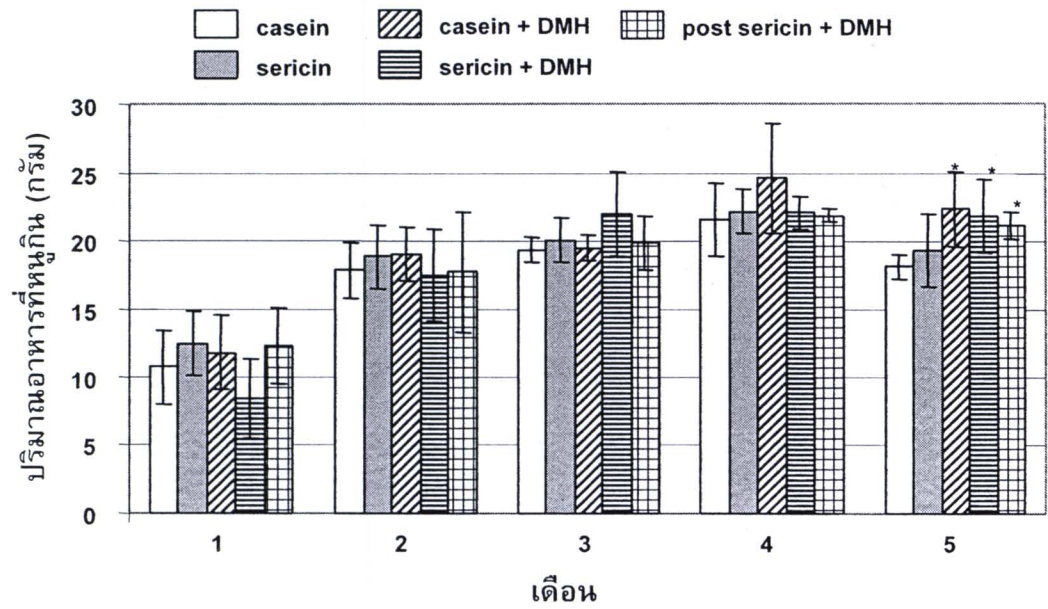
หลังจากสิ้นสุดการทดลอง 5 เดือน ได้ทำการเจาะเลือดจากหัวใจของหนูทดลองทุกกลุ่ม และส่งตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), blood urea nitrogen (BUN), creatinine และ uric acid ในเลือดหนูทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16 จากการทดลองพบว่า ส่วนในหนูทดลองกลุ่มที่ 3 กินอาหารที่มี 4% casein และได้รับ DMH 20 mg/kg มีระดับของเอนไซม์ที่บ่งบอกการทำงานของตับทุกชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่ 1 ที่กินอาหารที่มี 4% casein และไม่ได้รับสาร DMH แต่เนื่องจากค่าความแปรปรวนในหนูกลุ่มที่ 3 มีค่าสูงมาก จึงมีเฉพาะ ALP ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนค่าของ BUN, creatinine และ uric acid ที่บ่งบอกการทำงานของไต พบว่า หนูกลุ่มที่ 3 ยังคงมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับหนูทดลองกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่กินอาหารที่มี 4% sericin ก่อนและหลังการได้รับ DMH 20 mg/kg พบว่า ไม่มีความแตกต่างของระดับเอนไซม์ทุกตัวเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มที่ 1 และยังมีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ 3 ที่กินอาหารที่มี 4% casein และได้รับสาร DMH เหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่กินซีรีซิน มีการทำงานของตับและไตที่ดีกว่าหนูกลุ่มที่ 3 แม้ว่าทั้งสามกลุ่มนี้จะได้รับ DMH ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในปริมาณที่เท่าๆกัน

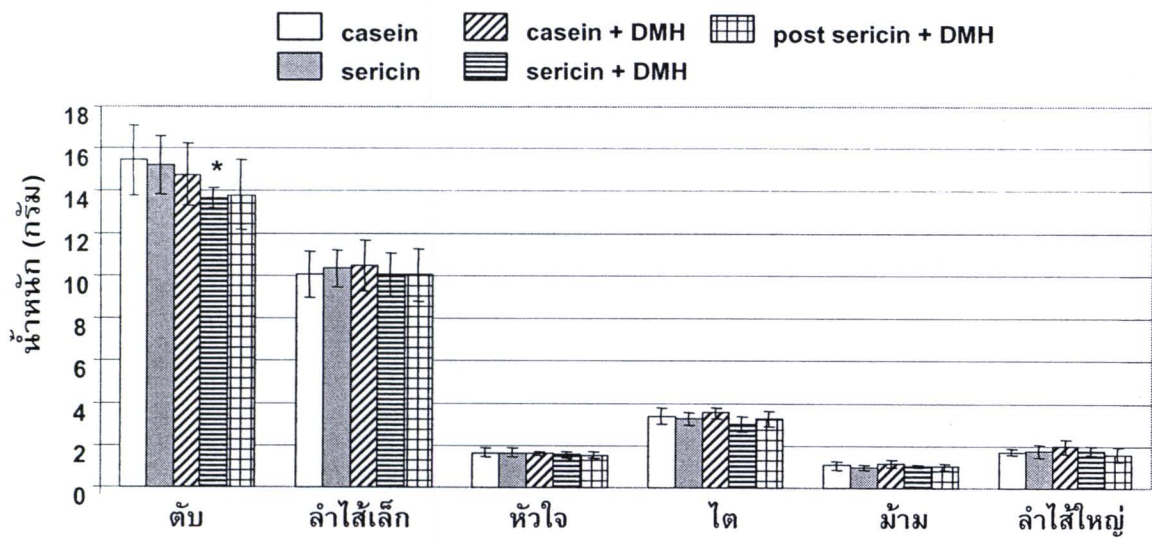


รูปที่ 17 น้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลอง ทำการบันทึกน้ำหนักของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่มในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD





รูปที่ 18 ปริมาณเฉลี่ยของอาหารที่หนูกิน ทำการบันทึกน้ำหนักของอาหารที่หนูทั้ง 5 กลุ่มกินในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD (* แสดงถึง $p\text{-value} \leq 0.05$)



รูปที่ 19 น้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะต่างๆ ของหนู หลังสิ้นสุดการทดลองในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ทำการเก็บและชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆของหนูทั้ง 5 กลุ่ม ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD (* แสดงถึง $p\text{-value} \leq 0.05$)

ตารางที่ 16 แสดงค่าเอนไซม์เฉลี่ยในเลือดของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม

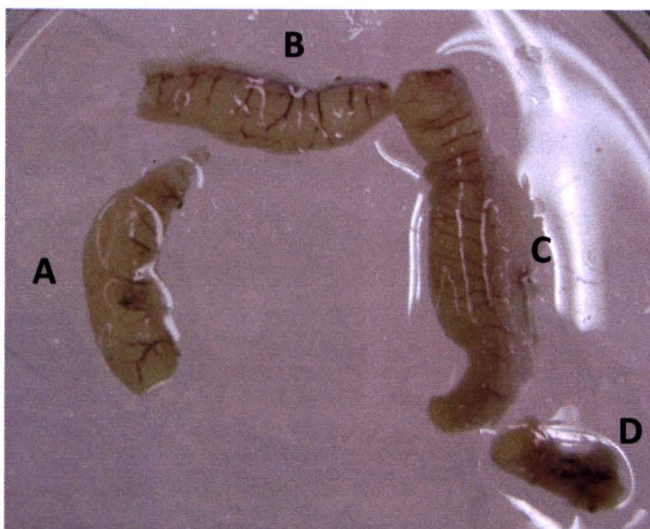
กลุ่มหนูทดลอง	เอนไซม์			
	ALP (U/L)	AST (%U/L)	ALT (%U/L)	LDH (U/L)
กลุ่ม 1 Casein	46.0 ± 4.8	225.0 ± 114.3	59.0 ± 24.3	2429.0 ± 681.0
กลุ่ม 2 Sericin	48.0 ± 14.2	255.0 ± 132.3	63.0 ± 22.2	2140.0 ± 662.8
กลุ่ม 3 Casein+DMH	58.0 ± 10.5*	663.0 ± 985.1	185.0 ± 226.1	3044.0 ± 1191.2
กลุ่ม 4 Sericin+DMH	49.0 ± 6.3	362.0 ± 265.3	63.0 ± 12.1	2645.0 ± 1144.1
กลุ่ม 5 Post sericin+DMH	50.0 ± 10.4	234.0 ± 81.5	58.0 ± 14.9	2744.0 ± 578.7

กลุ่มหนูทดลอง	เอนไซม์		
	BUN (%mg)	Creatinine (%mg)	Uric acid (%mg)
กลุ่ม 1 Casein	27.0 ± 2.8	0.5 ± 0.1	1.7 ± 0.4
กลุ่ม 2 Sericin	25.0 ± 2.2	0.5 ± 0.1	1.8 ± 0.6
กลุ่ม 3 Casein+DMH	30.0 ± 3.9	0.6 ± 0.1	3.4 ± 2.7
กลุ่ม 4 Sericin+DMH	25.0 ± 3.3	0.5 ± 0.2	1.8 ± 0.8
กลุ่ม 5 Post sericin+DMH	25.0 ± 3.0	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.5

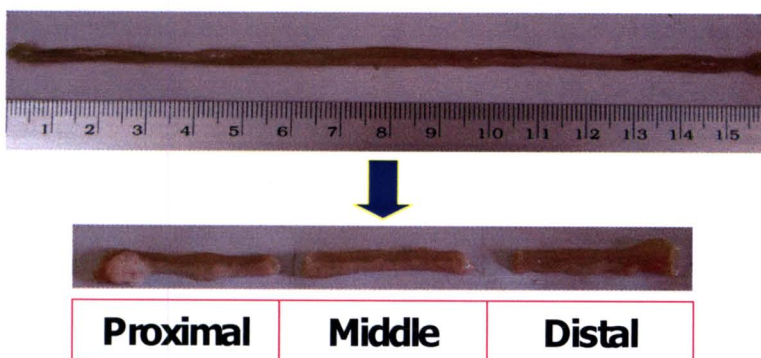
หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD (* แสดงถึง *p*-value ≤ 0.05)

4. ลักษณะของผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

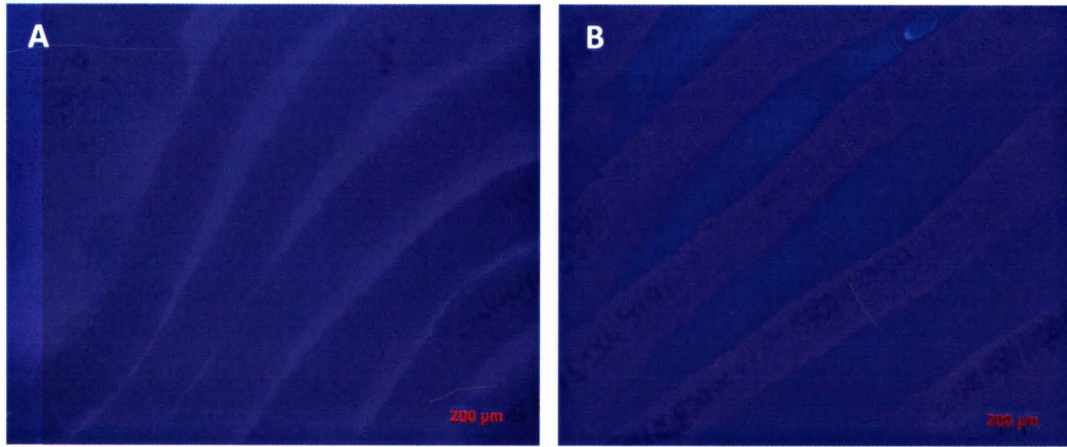
ในการวิเคราะห์การพัฒนาของการเกิดมะเร็งที่ส่วนต่างๆของลำไส้ใหญ่ ผู้วิจัยจึงได้ทำการแบ่งลำไส้ใหญ่เป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนต้น (proximal), ส่วนกลาง (middle) และส่วนปลาย (distal) (รูปที่ 20) ซึ่งในการทดลองเบื้องต้น ผู้วิจัยพบว่า ความยาวเฉลี่ยของลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กอปรกับลำไส้ใหญ่ของหนูไม่มีจุดที่แบ่งส่วนต่างๆอย่างชัดเจน ในการแบ่งส่วนของลำไส้ใหญ่ออกเป็น 3 ส่วนดังกล่าว เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง จึงทำโดยเฉลี่ยจากความยาวของลำไส้ใหญ่เป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน (รูปที่ 21) และเนื่องจากความยาวเฉลี่ยของลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละตัวมีความใกล้เคียงกัน จึงทำให้ความแตกต่างที่อาจเกิดขึ้นกับการแบ่งแยกส่วนต่างๆของลำไส้ใหญ่มีไม่มากนัก นอกจากนี้ผู้วิจัยสามารถบอกความแตกต่างของลำไส้ใหญ่แต่ละส่วนได้ เมื่อย้อมผนังของลำไส้ใหญ่ด้วย 0.2% methylene blue ซึ่งลำไส้ใหญ่ทั้ง 3 ส่วนนี้ จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยจะพบว่า ลำไส้ใหญ่ส่วนต้นมีลักษณะคล้ายลูกคลื่นขนาดใหญ่ (รูปที่ 22) ส่วนกลางมีลักษณะคล้ายเป็นแผ่นเรียบ (รูปที่ 23) และส่วนท้ายมีลักษณะคล้ายลูกคลื่น และพบลักษณะของ crypt กระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 24)



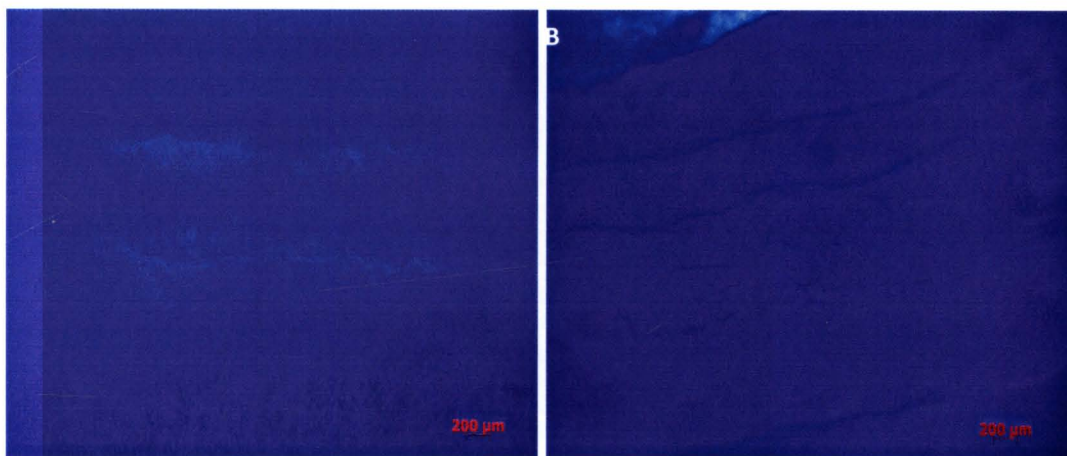
รูปที่ 20 ลักษณะภายนอกของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วย DMH (A คือ ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal), B คือ ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (middle), C คือ ลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (distal) และ D คือลำไส้ตรง (rectum))



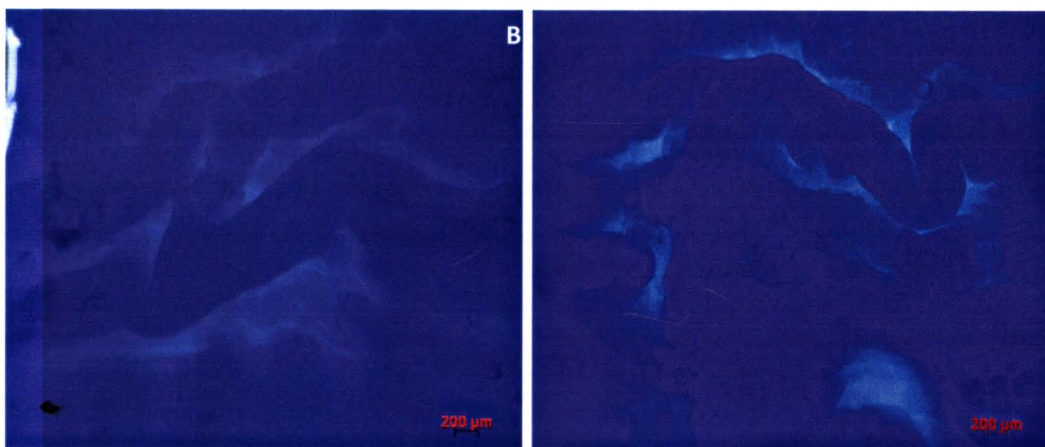
รูปที่ 21 การแบ่งลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง หลังสิ้นสุดการทดลองทำการแบ่งลำไส้ใหญ่ออกเป็น 3 ส่วน เท่าๆกัน คือ ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal), ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (middle), และลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (distal) ก่อนนำไปวิเคราะห์ ACF และทดสอบอื่นๆ



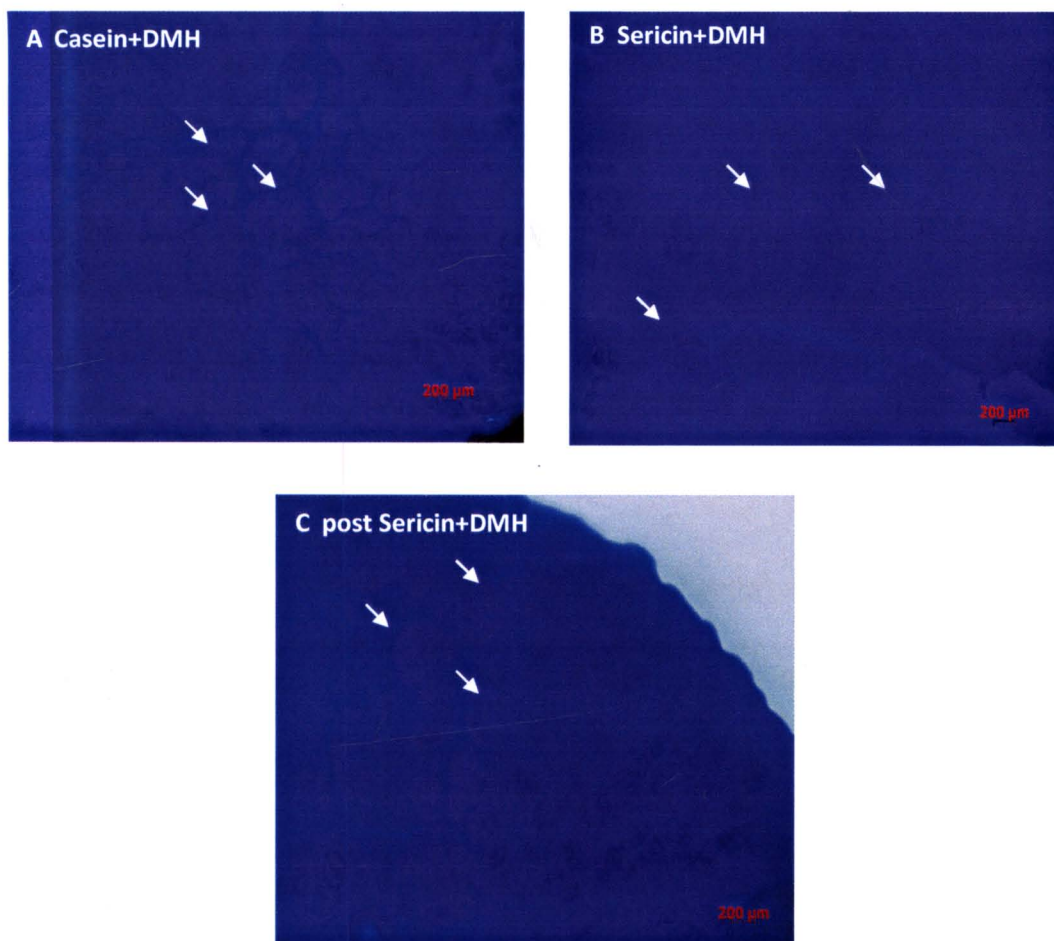
รูปที่ 22 ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue
A = กลุ่มที่ 1 (casein diet), B = กลุ่มที่ 2 (sericin diet)



รูปที่ 23 ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (middle) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue
A = กลุ่มที่ 1 (casein diet), B = กลุ่มที่ 2 (sericin diet)



รูปที่ 24 ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue
A = กลุ่มที่ 1 (casein diet), B = กลุ่มที่ 2 (sericin diet)



รูปที่ 25 การเกิด ACF ที่ผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลอง การวิเคราะห์ ACF ทำได้โดยย้อมผนังลำไส้ใหญ่ด้วย 0.2% methylene blue ปลายลูกศรชี้ไปที่ ACF (บางส่วน) A คือ กลุ่มที่ 3 กินอาหาร ที่มี 4% casein, B คือ กลุ่มที่ 4 กินอาหารที่มี 4% sericin และ C คือ กลุ่มที่ 5 กินอาหารที่มี 4% casein เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่มี 4% sericin ทุกกลุ่มจะได้รับการฉีด DMH 20 mg/kg สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 10 สัปดาห์ และทำการเก็บลำไส้ใหญ่เมื่อสิ้นสุดเวลา 5 เดือน

5. การวิเคราะห์ ACF ที่ผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

ในการตรวจสอบการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม สามารถตรวจสอบได้จากการเกิด Aberrant crypt foci (ACF) ที่ผนังของลำไส้ใหญ่ ในการทดลองครั้งนี้ ไม่พบการเกิด ACF ในกลุ่มควบคุม ที่กินอาหารที่มี 4% casein (กลุ่ม 1) และ 4% sericin (กลุ่ม 2) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ DMH พบว่า หนูมีพัฒนาการที่จะเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ทุกตัว โดยพบ ACF เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ของหนูในกลุ่มที่ได้รับ DMH ทุกตัว ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยลักษณะของ ACF เป็นดังแสดงในรูปที่ 25 นอกจากนี้ ที่ผนังของลำไส้ใหญ่ของหนู 2 ตัวจาก 6 ตัวของหนูกลุ่มที่ 3 (ได้รับ casein) ยังพบการพัฒนาของ ACF ที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้นจนเป็นลักษณะของก้อน tumor ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ไม่พบในกลุ่มที่ได้รับอาหารซิริซิน (กลุ่มที่ 4 และ 5) (ตารางที่ 17) จากผลการทดลองนี้ สามารถกล่าวได้ว่า อาหารที่มีซิริซินไม่สามารถยับยั้งการเกิด ACF ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร DMH ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ไปมีผลต่อการยับยั้งการเกิดก้อน tumor ได้

ตารางที่ 17 การเกิด ACF และ tumor ที่ผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง (n = 6)

กลุ่มหนูทดลอง	จำนวนที่พบ ACF (ตัว/ %)	จำนวนที่พบ Tumor (ตัว/ %)
กลุ่ม 1 Casein	0 / 0	0 / 0
กลุ่ม 2 Sericin	0 / 0	0 / 0
กลุ่ม 3 Casein+DMH	6 / 100	2 / 33
กลุ่ม 4 Sericin+DMH	6 / 100	0 / 0
กลุ่ม 5 Post sericin+DMH	6 / 100	0 / 0

6. ผลของซิริซินต่อการเกิด ACF ที่ผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

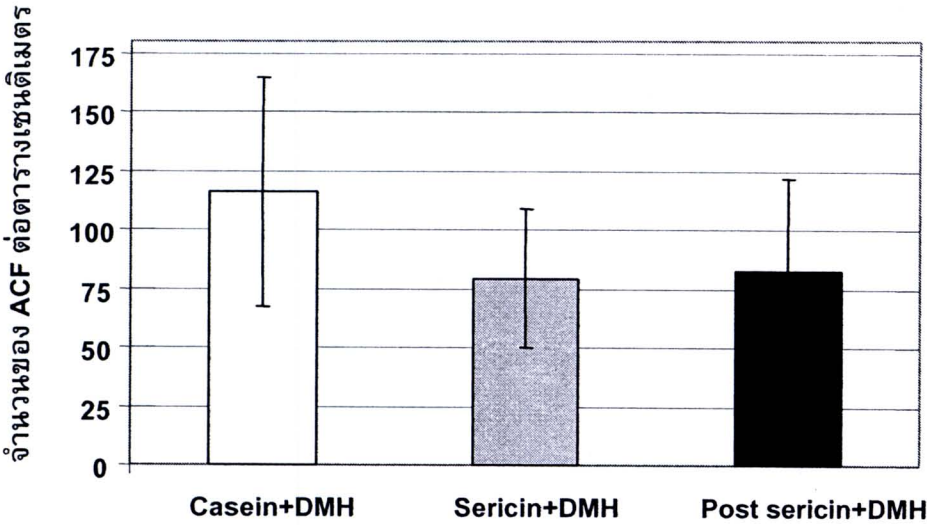
ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบจำนวนของ ACF ในหนูกลุ่มที่ได้รับ DMH ทั้ง 3 กลุ่ม เป็นไปตามตารางที่ 18 และรูปที่ 26 โดยพบว่าหนูที่กินอาหารควบคุม คือ อาหารที่มี 4% casein และได้รับ DMH 20 mg/kg (กลุ่มที่ 3) มีแนวโน้มของการเกิด ACF มากที่สุด โดยมีการเกิด ACF เฉลี่ยประมาณ 116 ACF ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนกลุ่มที่ 4 ที่กินอาหารที่มี 4% sericin และกลุ่มที่ 5 ซึ่งกินอาหารที่มี 4% casein เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่มี 4% sericin พบ ACF ในจำนวนใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 79.30 และ 82.40 ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ แม้ว่าจำนวน ACF ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีซิริซินทั้ง 2 กลุ่มจะมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม ค่าดังกล่าวพบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากจำนวน ACF ที่พบในลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละกลุ่มมีความแปรปรวนสูง

เมื่อทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของ ACF ในลำไส้ใหญ่ส่วนต่างๆ พบว่า ในหนูทั้ง 3 กลุ่ม พบการเกิด ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) มากที่สุด รองลงมาคือส่วนกลาง ส่วน ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้นนั้น พบเฉพาะในกลุ่มที่ 3 ที่กินอาหารที่มี 4% casein ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 จำนวน ACF ต่อพื้นที่ (ตารางเซนติเมตร) ในส่วนต่างๆ ของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

ส่วนของลำไส้ใหญ่	จำนวนเฉลี่ยของ ACF ต่อพื้นที่ (ซม ²)		
	กลุ่ม 3 (casein)	กลุ่ม 4 (sericin)	กลุ่ม 5 (post sericin)
ส่วนต้น	3.90 ± 5.30	0.00	0.00
ส่วนกลาง	38.00 ± 27.50	21.00 ± 18.50	28.40 ± 29.80
ส่วนปลาย	73.40 ± 27.00	57.80 ± 26.40	53.50 ± 22.80
รวมทุกส่วน	116.00 ± 48.50	79.30 ± 29.30	82.40 ± 39.80

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD



รูปที่ 26 การเกิด ACF ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่ได้รับ DMH ทำการนับจำนวนของ ACF (จำนวนต่อตารางเซนติเมตร) ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย DMH ทั้ง 3 กลุ่ม หลังจากระยะเวลา 5 เดือนของการทดลอง (หนูกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMH จะไม่พบ ACF จึงไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD

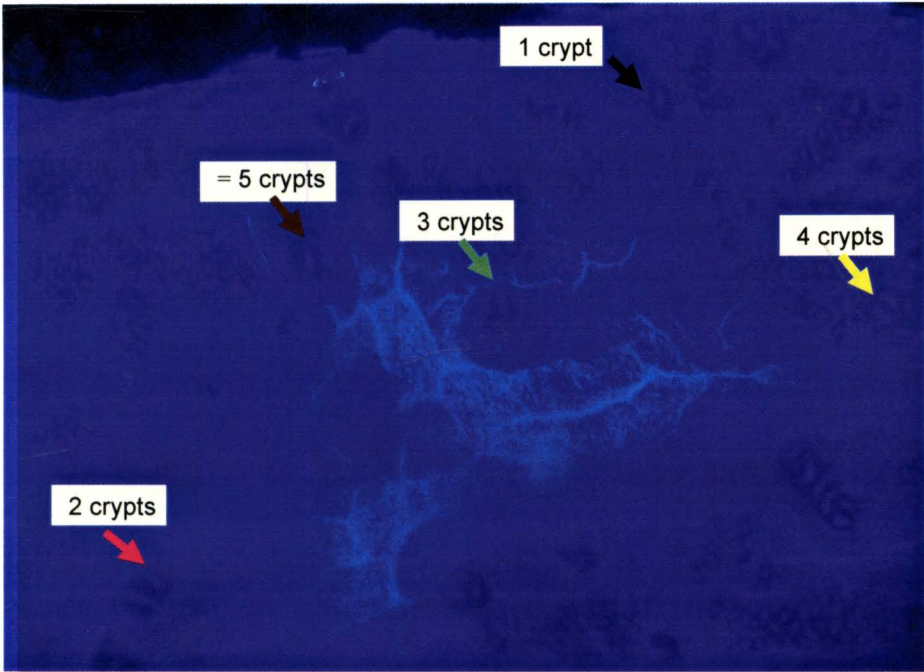
7. ผลของซิริซินต่อการดำเนินไปหรือพัฒนาการของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง

นอกจากจำนวน ACF ซึ่งเป็นสัญญาณของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่แล้ว ผู้วิจัยยังได้ประเมินระดับความรุนแรงของรอยโรคหรือการดำเนินไปของโรค (progression) โดยการประเมินจำนวนของ aberrant crypt ที่พบในแต่ละ ACF โดยในการเกิด ACF แต่ละ ACF หรือ foci อาจประกอบด้วย crypt ในจำนวนที่แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มเป็นตั้งแต่ 1 จนถึง มากกว่า 5 crypt/foci เนื่องจากในกรณีที่มีจำนวนตั้งแต่ 5 crypt/foci ขึ้นไปจะไม่สามารถนับจำนวน crypt ได้อย่างชัดเจนจึงต้องรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ตามที่แสดงในรูปที่ 27 ซึ่งถ้าในแต่ละ foci มีจำนวน crypt มาก แสดงว่ามีการดำเนินไปของโรคหรือมีความรุนแรงของโรคมก

เนื่องจากการพบ ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลายมากที่สุด ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ ACF เฉพาะที่ลำไส้ใหญ่ส่วนนี้ ผลการวิเคราะห์ พบว่า จำนวน ACF ส่วนใหญ่เป็น ACF ที่มีจำนวนของ crypt ≥ 5 crypt/foci (ตารางที่ 19, รูปที่ 28) ส่วนจำนวนของ ACF ที่มีขนาดเล็กกว่า คือ มี 1 – 4 crypt/foci มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างหนูทั้ง 3 กลุ่ม โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองจะเห็นว่า ACF ขนาดใหญ่ คือ มี ≥ 5 crypt/foci ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีซิริซินทั้ง 2 กลุ่ม จะมีประมาณ 28 และ 21 ACF (กลุ่ม 4 และ 5 ตามลำดับ) ซึ่งมีแนวโน้มที่พบในจำนวนที่ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ casein (37 ACF) แต่เนื่องจากความแปรปรวนของจำนวน ACF ของหนูแต่ละกลุ่มมีค่าสูง จึงทำให้เฉพาะหนูในกลุ่มที่ 5 มีจำนวนของการเกิด ACF ที่มี ≥ 5 crypt/foci น้อยกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในการวิเคราะห์จำนวนของ ACF ขนาดใหญ่ในกลุ่มที่มี ≥ 5 crypt/foci อาจไม่ได้บ่งบอกถึงความแตกต่างของการดำเนินไปของโรคหรือความรุนแรงของโรคที่แท้จริงได้ เนื่องจากขนาดของ ACF จะขึ้นกับจำนวนของ crypt ที่พบในแต่ละ ACF ซึ่งในที่นี้ไม่สามารถนับจำนวนได้ ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ขนาดของ ACF ประเภทนี้ (≥ 5 crypt/foci) ด้วยการวัดพื้นที่ของแต่ละ ACF เป็นตารางมิลลิเมตรและหาค่าเฉลี่ย ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 29 พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ 4 ที่ได้รับซิริซินมีพื้นที่เฉลี่ยของ ACF ประมาณ 0.11 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งมีพื้นที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ casein ซึ่งมีพื้นที่เฉลี่ยของ ACF ประมาณ 0.14 ตารางมิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ได้รับซิริซินหลังการฉีด DMH (กลุ่มที่ 5) ไม่แสดงผลที่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ casein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ขนาดของ ACF ทั้งการพิจารณาจากจำนวนของ aberrant crypt ต่อ ACF และการวัดพื้นที่ของแต่ละ ACF แสดงให้เห็นว่า การกินอาหารที่มีซิริซินก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร DMH สามารถลดจำนวนความหนาแน่นของ ACF (ACF density) และ crypt multiplicity ได้ และในการกินอาหารที่มีซิริซินภายหลังได้รับสาร DMH ก็ยังสามารถลดอัตราการเกิด ACF (ACF formation) ได้ จากข้อมูลนี้จึงสอดคล้องกับการที่ซิริซินมีผลในการลดความรุนแรงหรือชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้



รูปที่ 27 การประเมินการดำเนินไปหรือความรุนแรงของโรค โดยทำการวิเคราะห์ผนังลำไส้ใหญ่ด้วยการนับจำนวน crypt ต่อ ACF ซึ่งถูกสรแสดงลักษณะของ ACF ที่มีจำนวน crypt ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 ถึง >5 crypt /ACF รูปนี้เป็นภาพตัวอย่างจากลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูที่ฉีด DMH ภายหลังการย้อมด้วย methylene blue ภายใต้อุปกรณ์ inverted microscope (40x)

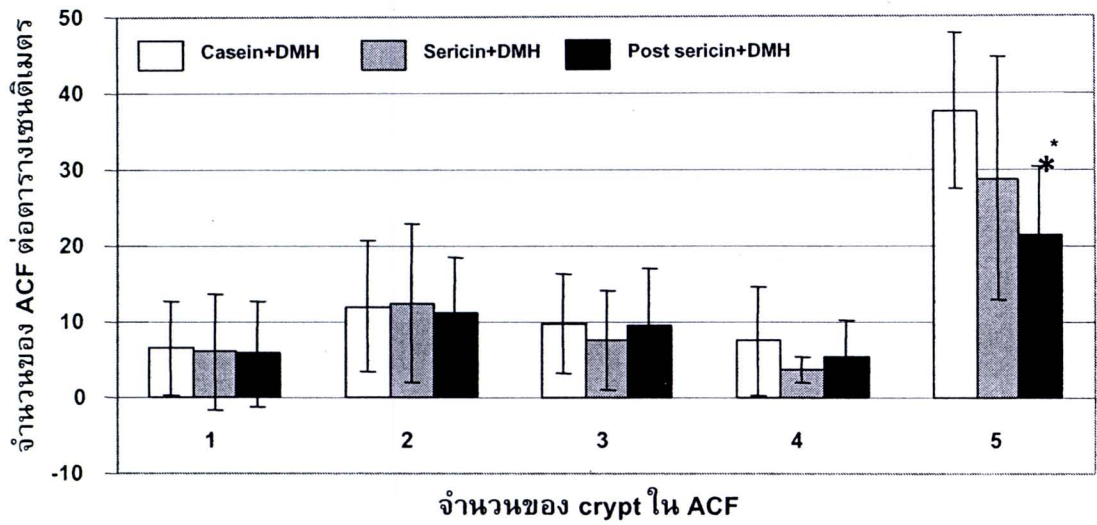
ตารางที่ 19 การแบ่งประเภทของ ACF ตามจำนวนของ crypt ที่พบในแต่ละ ACF

ประเภทของ ACF	จำนวน ACF ต่อพื้นที่ (ซม ²)		
	กลุ่ม 3 (casein)	กลุ่ม 4 (sericin)	กลุ่ม 5 (post-sericin)
1 crypt/ACF	6.49 ± 6.27	6.06 ± 7.69	5.84 ± 6.96
2 crypts/ACF	12.01 ± 8.70	12.34 ± 10.48	11.26 ± 7.19
3 crypts/ACF	9.74 ± 6.49	7.58 ± 6.49	9.52 ± 7.47
4 crypts/ACF	7.47 ± 7.14	3.68 ± 1.73	5.41 ± 4.89
≥ 5 crypts/ACF	37.66 ± 10.12	28.79 ± 15.79	21.43 ± 9.03*

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD

เป็นการวิเคราะห์ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH

* *p*-value ≤ 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3



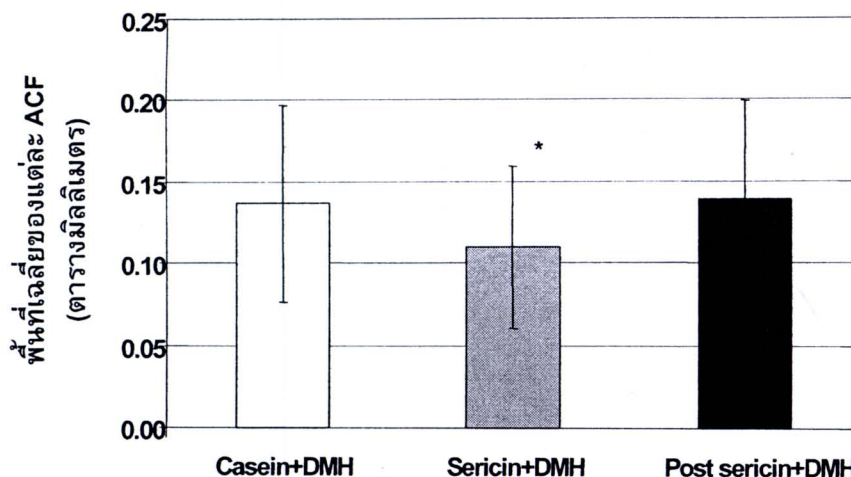
รูปที่ 28 การกระจายตัวของ ACF ขนาดต่างๆ ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ทำการวิเคราะห์แยกประเภทของ ACF ตามจำนวนของ crypts ที่พบในแต่ละ ACF ซึ่งพบตั้งแต่ 1 ถึง ≥ 5 crypt/ACF ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลอง หลังจากระยะเวลา 5 เดือนของการทดลอง ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SD (* แสดงถึง $p\text{-value} \leq 0.05$)

ตารางที่ 20 พื้นที่เฉลี่ยของ ACF ขนาดใหญ่ (มีจำนวน ≥ 5 crypts/ACF)

	พื้นที่เฉลี่ยของ ACF (mm ²)		
	กลุ่ม 3 (casein)	กลุ่ม 4 (sericin)	กลุ่ม 5 (post-sericin)
ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย	0.14 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.05*	0.14 $\pm$ 0.06

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean $\pm$ SD ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH

* $p\text{-value} \leq 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3



รูปที่ 29 พื้นที่เฉลี่ยของ ACF ที่พบในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูที่ได้รับ DMH ทำการวัดพื้นที่ของ ACF ขนาดใหญ่ (คือ ACF ที่มีจำนวน ≥ 5 crypts/ACF) ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SD (* แสดงถึง p -value ≤ 0.05)

8. ผลของซีรีซินต่อการเกิด lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

การเกิด lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองในการทดลองนี้ใช้วิธี TBARs assay (ตารางที่ 21) โดยอัตราการเกิดของ malondialdehyde (MDA) product แสดงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของ lipid peroxidation เนื่องจากการกินอาหารที่มีซีรีซินจะแสดงลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลายโดยตรง เราจึงทำการตรวจสอบการเกิด lipid peroxidation ในส่วนปลายเป็นอันดับแรก จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ลำไส้ใหญ่ของหนูกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ DMH มีแนวโน้มในการเกิด oxidative stress ได้มากกว่าหนูปกติ ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับซีรีซินและ DMH (กลุ่มที่ 4 และ 5) พบว่ามีค่า lipid peroxidation ต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ 3 ถึงแม้ผลการทดลองที่ได้นี้จะไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญ เนื่องจากมีความแปรปรวนระหว่างหนูแต่ละตัวค่อนข้างสูง

ตารางที่ 21 แสดงการเกิด lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) ของหนูทดลอง

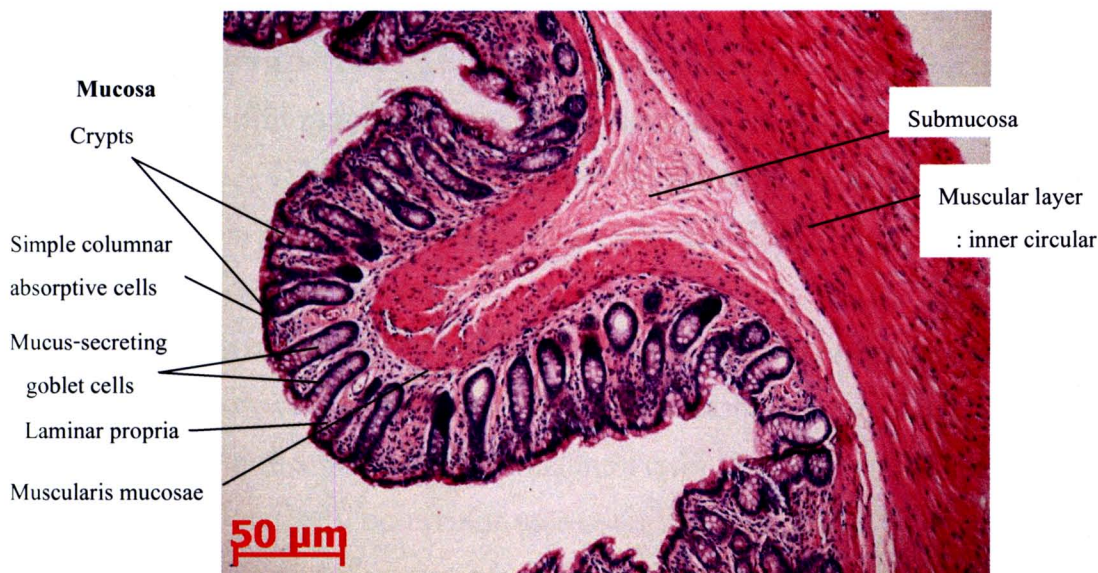
กลุ่มหนูทดลอง	MDA concentration (μ M)
กลุ่ม 1 Casein	1.26 $\pm$ 0.51
กลุ่ม 2 Sericin	0.81 $\pm$ 0.21
กลุ่ม 3 Casein+DMH	1.77 $\pm$ 1.26
กลุ่ม 4 Sericin+DMH	1.08 $\pm$ 0.71
กลุ่ม 5 Post sericin+DMH	1.15 $\pm$ 0.64

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean $\pm$ SD ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลอง

9. ลักษณะทาง Histopathology ของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

ลำไส้ใหญ่เป็นส่วนที่ต่อจากลำไส้เล็ก (small intestine) ทำหน้าที่ในการดูดน้ำและเกลือแร่กลับสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยในการบีบตัวให้กากอาหารเคลื่อนตัวไปสู่ลำไส้ตรง (rectum) ได้ก่อนที่จะทำการกำจัดออกในรูปของอุจจาระ ผนังของลำไส้ใหญ่แบ่งประกอบด้วยชั้น mucosa, submucosa, muscular layer และ serosa ลักษณะผนังของลำไส้ใหญ่ชั้น mucosa มีการพับ (fold) ไม่โป่งพองออก (non-distended) และไม่มี plicae circulares เหมือนในลำไส้เล็ก ลักษณะของเซลล์ที่พบในชั้นนี้ ประกอบด้วย เซลล์ 2 ชนิด คือ absorptive cells และ mucus-secreting goblet cells ซึ่งเรียงตามความยาวของ tubular glands หรือ crypts ซึ่งเชื่อมต่อไปถึงส่วนของ muscularis mucosae ซึ่งลักษณะของ absorptive cells จะเป็นแบบ simple columnar คือเซลล์ที่มีรูปร่างแท่ง นิวเคลียสรูปไข่ เรียงตัวชั้นเดียว พบมากในส่วนของ luminal surface ทำหน้าที่ในการดูดน้ำและเกลือแร่กลับสู่ร่างกาย ส่วน mucus-secreting goblet cells เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเมือก (mucus) เพื่อเคลือบผนังของลำไส้ใหญ่ให้อุจจาระผ่านออกไปได้ง่าย รูปร่างของเซลล์ค่อนข้างกลม นิวเคลียสขนาดเล็กและแน่น มักพบในส่วนฐานของ crypts ในส่วนของ lamina propria เป็นเนื้อเยื่อประสาน (connective tissue) ประกอบด้วยคอลลาเจน (collagen), เซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และเซลล์พลาสมา (plasma cells) จำนวนมาก ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัด และป้องกันสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ (Tanaka, et al., 2009)

ในระหว่างชั้น mucosa และ submucosa มี muscularis mucosae เป็นตัวแบ่งระหว่างชั้นทั้งสอง ซึ่งผนังลำไส้ใหญ่ชั้น submucosa ส่วนมากจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อประสาน เส้นเลือด (blood vessels) และเส้นประสาท (nerves) และในชั้นของ muscular layer ประกอบด้วยกล้ามเนื้อ 2 ชั้น ชั้นในสุดเรียงตัวเป็นวงกลมรอบท่อ (inner circular) และชั้นนอกเรียงตัวตามความยาวของท่อ (outer longitudinal) ทำหน้าที่ช่วยในการหดตัวของลำไส้ใหญ่เป็นจังหวะ (rhythmic contraction) ป้องกันการอุดตันของท่อ และขับเมือกออกไปได้ และชั้นนอกสุด serosa มี peritoneum หุ้มรอบ (Tanaka, et al., 2009) (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 ลักษณะของผนังลำไส้ใหญ่ของหนูเมื่อตัดตามแนวขวาง (transverse section) ตัวอย่างลำไส้ใหญ่ของหนูปกติ ที่ย้อมด้วย H&E staining

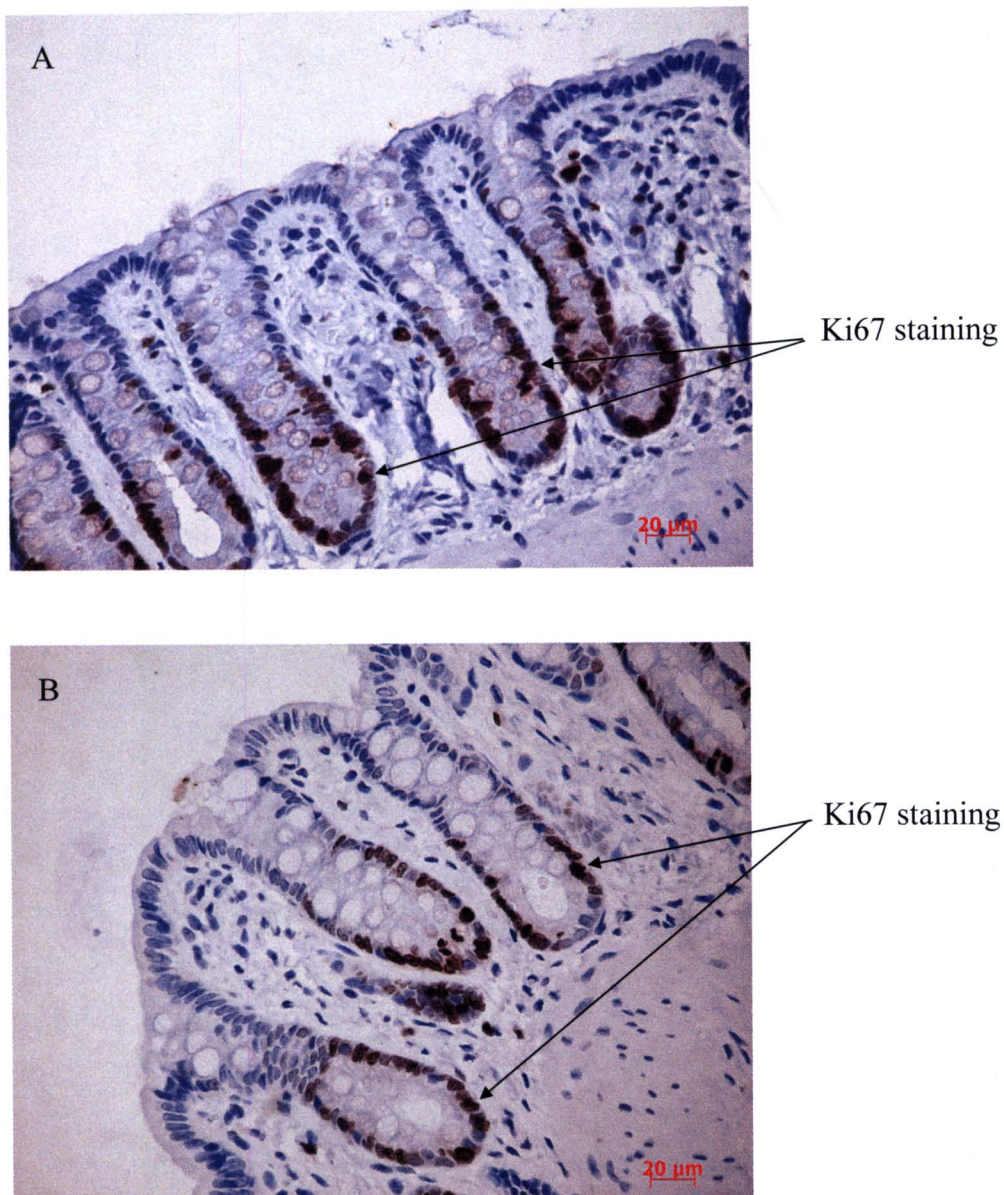
10. การแสดงออกของ Ki67 ภายในผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง

ในการตรวจสอบเซลล์ที่มีคุณสมบัติของการเป็นเซลล์มะเร็ง อาจทำได้โดยการประเมินจำนวนเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ในเนื้อเยื่อนั้นๆ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์จำนวนของเซลล์ชนิดนี้ใน crypt ของผนังลำไส้ใหญ่ ซึ่งทำได้โดยการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่ช่วยในการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) ซึ่งโปรตีน Ki67 นี้จะแสดงออกเมื่อเซลล์อยู่ในสถานะที่มีการแบ่งตัวและสามารถเพิ่มจำนวนได้ (ระยะ G1, G2, S และ M) ของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) แต่จะไม่แสดงออกเมื่อเซลล์อยู่ในสถานะพัก (ระยะ G0) (Ishida, et al., 2004) (Scholzen and Gerdes, 2000) จึงสามารถใช้เป็นตัวแทนของ proliferation marker ได้ ซึ่งแสดงออกของโปรตีน Ki67 ทำโดยการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry จากรูปที่ 31 จะสังเกตเห็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Ki67 ได้จากการติดสีน้ำตาลในนิวเคลียสของเซลล์ที่อยู่ในสถานะของกระบวนการเพิ่มจำนวน (proliferation state) จากการทดลองครั้งนี้พบว่า รูปร่างส่วนใหญ่ของ crypts ในลำไส้ใหญ่ของหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ DMH ทั้ง 2 กลุ่ม (กินอาหารที่มีเคซีนและซิริซินเป็นองค์ประกอบ) มีขนาดและความยาวที่ใกล้เคียงกัน และติดสีน้ำตาลในนิวเคลียสของเซลล์ที่อยู่บริเวณฐานของ crypts เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 31) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณฐานของ crypts เป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากใน

สถานะปกติเซลล์ที่อยู่บริเวณนี้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ซึ่งต้องมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา เพื่อทำหน้าที่สร้างเซลล์ใหม่ที่เป็นองค์ประกอบของ crypts เซลล์ที่สร้างขึ้นจะเคลื่อนที่และดันเซลล์ที่อยู่ด้านบนขึ้นไปเรื่อยๆ ตามความยาวของ crypts เมื่อใกล้ถึงบริเวณ luminal surface เซลล์ดังกล่าวจะสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนโดยหยุดวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle arrest) (Clevers, 2006) ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ใกล้ luminal surface จึงไม่ติด Ki67 โดยเซลล์เหล่านี้อาจมีบางส่วนที่จะ differentiate เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น absorptive cells และ mucus-secreting goblet cells เป็นต้น หรือบางส่วนที่จะตายและหลุดลอกออกไป (van de Wetering, et al., 2002)

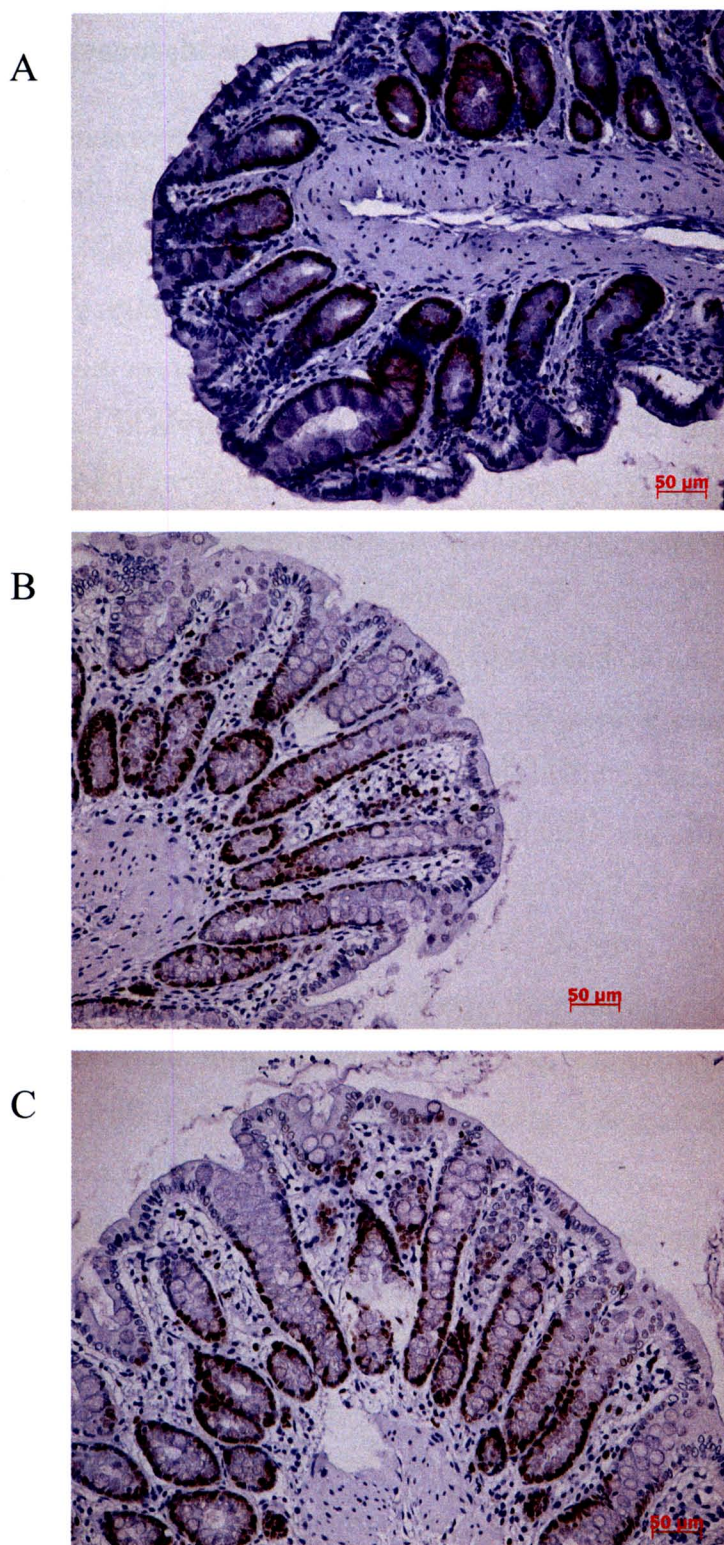
ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย DMH ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า ทั้งลักษณะรูปร่างของ crypts และการแสดงออกของโปรตีน Ki67 มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งทั้งสองกลุ่ม โดยจะพบว่า หนูกลุ่มที่ 3 ที่กินเคซีนเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 32A) มีรูปร่างที่ผิดปกติไปอย่างเห็นได้ชัด โดย crypts มีขนาดที่อ้วนและสั้น ส่วนการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ยังคงพบได้ในส่วนของเซลล์ที่อยู่บริเวณฐานของ crypts และสูงขึ้นมาจากฐานเพียงเล็กน้อย แต่ในหนูที่กินอาหารที่มีชิริซินเป็นองค์ประกอบทั้งสองกลุ่ม (รูปที่ 32B และ 32C) จะพบว่ารูปร่างของ crypts นั้นมีความยาวที่เพิ่มมากขึ้น และการแสดงออกของโปรตีน Ki67 จะพบว่า เซลล์ที่นิวเคลียสติดสีน้ำตาลนั้นพบได้ในเซลล์ที่อยู่ตั้งแต่บริเวณฐานของ crypts ไปจนเกือบตลอดความยาวของ crypts และไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดเหมือนกับในสถานะของลำไส้หนูปกติ

จากการสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะของ crypt และการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในแต่ละ crypts ของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม จึงทำให้สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อดูผลของโปรตีนชิริซินต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน crypts เมื่อได้รับสารเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ นอกเหนือจากการนับจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 แล้ว ผู้วิจัยยังจะทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 (Ki67-positive cells) ภายใน crypt ร่วมกับการวัดขนาดความยาวของ crypts ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยใช้ตัวแทนของ crypts ของหนูแต่ละตัวจำนวน 60 crypts ของหนูทั้ง 6 ตัว (10 crypts ต่อหนู 1 ตัว) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยจะทำการนับจากจำนวนสไลด์ 3-5 สไลด์



รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง ทำการตรวจสอบโปรตีน Ki67 ด้วยวิธี immunohistochemistry ภาพที่แสดงเป็นผนังลำไส้ใหญ่ของหนูกลุ่มควบคุม (A casein diet; B sericin diet)





รูปที่ 32 การแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่เป็นมะเร็ง ทำการตรวจสอบโปรตีน Ki67 ด้วยวิธี immunohistochemistry ภาพที่แสดงเป็นผนังลำไส้ใหญ่ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ DMH ทั้ง 3 กลุ่ม (A casein; B sericin และ C post-sericin)

11. ผลของชิริซินต่อการแสดงออกของโปรตีน Ki67

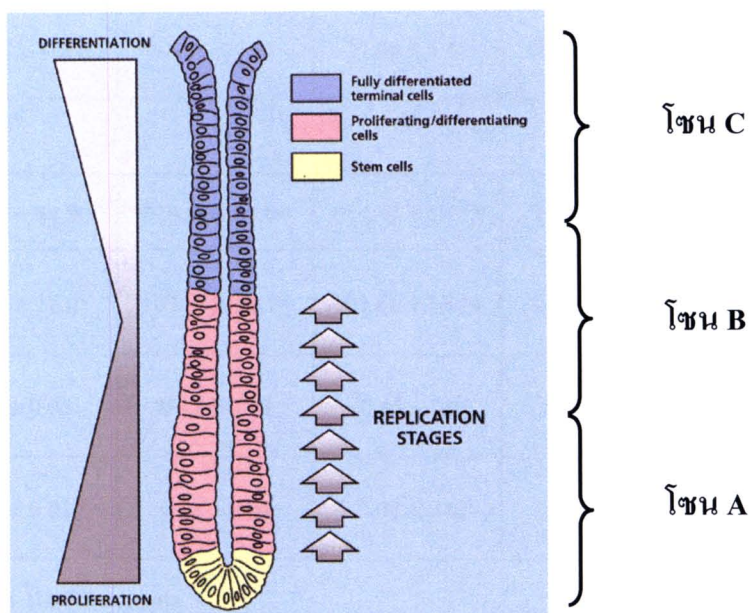
ในการวิเคราะห์จำนวนและการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์โดยเลือก crypt ที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ คือ มีความยาวตลอดตั้งแต่ฐานจนถึงด้านบนของ crypt ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็น crypt ที่มีลักษณะปกติ (normal looking crypt) ที่กระจายตัวอยู่ทั่วไปบนผนังลำไส้ใหญ่ ไม่ใช่ crypt ใน ACF เนื่องจากการยากที่จะวิเคราะห์ crypt ใน แต่ละ ACF ในกรณีของการเตรียม slide ในลักษณะของการตัดในแนวขวางของลำไส้ ซึ่งการตัดผ่าน ACF เป็นสิ่งที่ไม่อาจคาดการณ์ได้ ทำให้ไม่สามารถกำหนดจำนวน crypt ให้ได้จำนวนมากพอในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ crypt ที่อยู่ในแต่ละ ACF อาจมีรูปร่างและขนาดที่ผิดปกติไป เพราะอยู่ระหว่างกระบวนการที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ในเชิงของจำนวนได้ (quantitative analysis) จึงต้องเลือกวิเคราะห์จาก crypt ที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ในหนูแต่ละกลุ่ม เพื่อให้สามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกันได้

ในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยการได้วิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์ในแต่ละ crypt โดยใช้ Ki67 marker (ตารางที่ 22) จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ติด Ki67 positive cells ซึ่งแสดงถึงเซลล์ที่กำลังมีการเพิ่มจำนวน ในหนูกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่กินชิริซินก่อนและหลังได้รับสาร DMH มีค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่กำลังเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (กลุ่มที่ 1 และ 2) ส่วนกลุ่ม 3 ที่กินเคซีนและได้รับสาร DMH แสดงให้เห็นว่า การที่กินชิริซินอาจจะมีผลในการช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้เร็วขึ้น ซึ่งเมื่อทำการวัดขนาดความยาวของแต่ละ crypt ในหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม พบว่า หนูกลุ่มที่ 4 และ 5 มี crypt ที่มีความยาวมากกว่ากลุ่มที่ 1, 2 และ 3 แต่เนื่องจากมีความแปรปรวนของข้อมูลในหนูแต่ละตัวค่อนข้างสูง จึงทำให้มีเพียงกลุ่มที่กินชิริซินหลังการได้รับสาร DMH (กลุ่มที่ 5) เท่านั้นที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่เพิ่มมากขึ้น

โดยปกติเซลล์จะมีการแบ่งตัวมากที่สุดบริเวณที่ฐาน crypt และจะลดลงเรื่อยๆ ที่ส่วนบนของ crypt ดังนั้น Ki67 positive cells จะพบมากที่บริเวณฐานของ crypt จึงได้ทำการวิเคราะห์ระยะทางที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 จากบริเวณฐานของ crypt ไปยังตำแหน่งที่มีการติด Ki67 ที่สูงสุดของ crypt จากการวิเคราะห์พบว่า หนูกลุ่มที่ 4 และ 5 มี Ki67 positive cells ที่อยู่ในตำแหน่งสูงกว่าหรือใกล้กับส่วนบนของ crypt มากกว่าหนูกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์จำนวน Ki67 positive cells ต่อความยาวของ crypt ซึ่งแสดงถึงความหนาแน่นของ Ki67 positive cells ยังพบว่า หนู 2 กลุ่มนี้ มีแนวโน้มที่จะมีความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า หนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และกินอาหารที่มีชิริซิน crypt ในลำไส้ใหญ่ของหนูเหล่านี้อยู่ในภาวะที่แบ่งตัวได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กินอาหารเคซีน

ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของ Ki67 positive cells ผู้ทำการวิจัยได้แบ่งความยาวของ crypt ออกเป็น 3 โซน (โซน A, B และ C) โดยแบ่งตามสภาวะปกติของเซลล์ใน crypt ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 หรือสภาวะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นหลัก โดยแบ่ง crypt ออกเป็น 3 โซนเท่าๆ

กัน โซน A เป็นบริเวณที่มีเซลล์ที่แบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลาเนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในบริเวณนี้ส่วนมากเป็น progenitor proliferating cells และ stem cells จึงทำให้มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 มากที่สุด โซน B เป็นบริเวณที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนและมีเซลล์บางส่วนที่เป็น differentiated cells แล้ว จึงทำให้มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ร่องลงมาจากโซน A ส่วนโซน C เป็นบริเวณที่เซลล์ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น differentiated cells แล้ว จึงทำให้พบเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 น้อยที่สุด (รูป 33)



รูปที่ 33 รูปแบบการแบ่งโซนในการประเมินการแสดงออกของโปรตีน Ki67

จากการวิเคราะห์จำนวนของ Ki67 positive cells ในแต่ละโซนของ crypt ดังแสดงในตารางที่ 22 พบว่า ในโซน A หรือที่ฐานของ crypt ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา จึงพบ Ki67 positive cells มากที่สุด และพบในจำนวนลดลงใน โซน B และ C ตามลำดับ แต่กลุ่มที่ 4 และ 5 พบว่า มีจำนวนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ทั้ง 3 โซน มากกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้น

ตารางที่ 22 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในลำไส้ใหญ่ ของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม

	กลุ่มหนูทดลอง				
	กลุ่ม 1 Casein	กลุ่ม 2 Sericin	กลุ่ม 3 Casein +DMH	กลุ่ม 4 Sericin + DMH	กลุ่ม 5 Post-sericin + DMH
Ki67 positive cells					
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (cells/crypts)	15.78 ± 3.00	18.25 ± 6.97	17.08 ± 4.42	28.55 ± 10.32 ^{*†}	29.82 ± 9.55 ^{*†#}
ความยาวของ crypt (µm)					
ความยาวทั้งหมด (µm)	220.62 ± 34.90	228.64 ± 34.90	224.42 ± 19.55	237.30 ± 46.67	270.08 ± 13.83 ^{*†#}
ความยาวของ Ki67 (µm)	102.93 ± 18.08	107.61 ± 29.74	101.66 ± 16.14	147.83 ± 46.58	174.12 ± 27.45 ^{*†#}
Relative distance of Ki67 positive cells	0.46 ± 0.05	0.47 ± 0.08	0.45 ± 0.05	0.62 ± 0.10 ^{*†#}	0.64 ± 0.10 ^{*†#}
Relative total number of Ki67 per total length	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.03 ^{*#}	0.11 ± 0.04
การกระจายของ Ki67 positive cells ในแต่ละ crypts					
โซน A	11.63 ± 2.30	14.05 ± 5.36	12.33 ± 3.39 [*]	17.63 ± 3.22 ^{*†#}	17.67 ± 5.23 ^{*†}
โซน B	5.02 ± 2.17	4.52 ± 2.17	4.73 ± 2.30	9.70 ± 5.89	10.85 ± 4.45 ^{*†#}
โซน C	0.07 ± 0.10	0.05 ± 0.12	0.03 ± 0.05	1.17 ± 1.79	1.30 ± 1.35 [†]

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean ± SD ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH

* $p\text{-value} \leq 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม 1 Casein

† $p\text{-value} \leq 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม 2 Sericin

$p\text{-value} \leq 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม 3 Casein + DMH

12. ผลของซีริซินต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2

ส่วนการสังเกตการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่พบในเซลล์ที่อยู่ใน crypt ทั้ง 5 กลุ่มการทดลองพบว่า เซลล์ทุกเซลล์ที่อยู่ใน crypt มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ทุกเซลล์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างหนูในกลุ่มควบคุมปกติ และกลุ่มที่ได้รับสาร DMH ทั้ง 3 กลุ่ม (ไม่ได้แสดงรูปภาพ) จึงไม่สามารถนำกลไกที่กล่าวว่าจะเกี่ยวข้องกับที่ซีริซินมีผลต่อการยับยั้งการตายของเซลล์อยู่ใน crypt มาเกี่ยวข้องได้

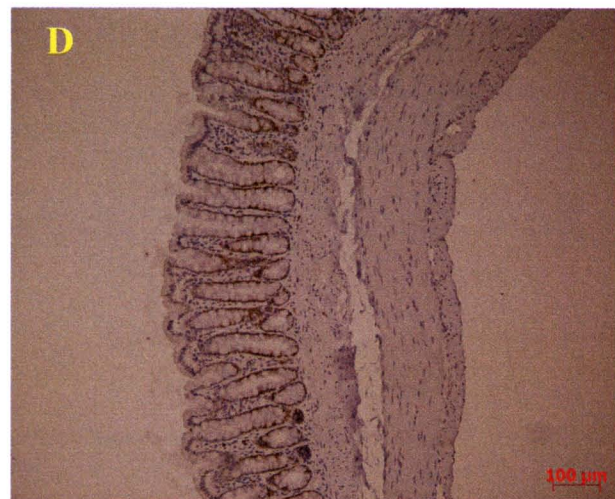
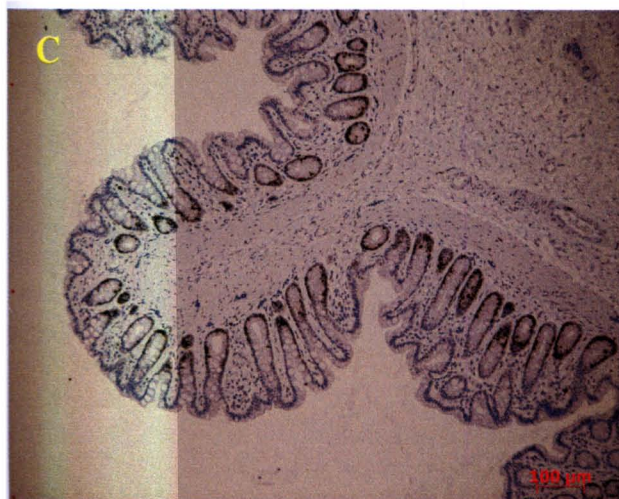
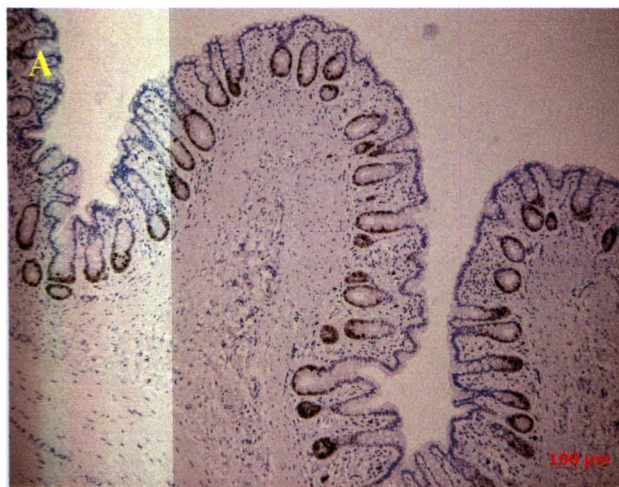
13. ลักษณะทางกายภาพของผนังลำไส้ใหญ่

เนื่องจากการวิเคราะห์ข้างต้นนี้ เป็นการวิเคราะห์จาก crypt ที่มีลักษณะปกติ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์ในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ของลักษณะของผนังลำไส้ใหญ่ หรือลักษณะของ crypt ของหนูแต่ละกลุ่ม โดยจะพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพหรือ morphology ของผนังลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละกลุ่ม เมื่อสังเกตลักษณะรูปร่างของแต่ละ crypt ในหนูกลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่ม (รูปที่ 34) พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อยในด้านความยาวของ crypt ที่พบระหว่างทั้งสองกลุ่ม โดยในหนูกลุ่มที่กินชิริชิน มีแนวโน้มที่รูปร่างของ crypt ก่อนข้างเรียวยาวกว่าหนูที่กินเคซีนที่มีขนาดค่อนข้างกว้างและสั้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ crypt ในทั้งสองกลุ่มก็ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 22) ซึ่งลักษณะของเซลล์ columnar มีการเรียงตัวที่เป็นระเบียบ ตลอดความยาวของ crypt ไปจนถึงส่วนของ surface mucosa ซึ่งลักษณะที่พบมีความสอดคล้องกันลักษณะรูปร่างทั่วไปของ crypt ที่ปกติ (Potter, et al., 2004; Tanaka, et al., 2009)

ส่วนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะของ crypt ในหนูกลุ่มที่ได้รับสาร DMH ทั้ง 3 กลุ่ม (รูปที่ 35-37) ในหนูกลุ่มที่กินเคซีน พบว่ามีรูปร่างการม้วนพับของ colonic mucosa ที่ผิดปกติ (รูปที่ 35A) มีการเพิ่มจำนวนของ ACF ที่เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติ (รูปที่ 35B) ซึ่งจะเห็นได้จากการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในกลุ่มของ crypt ที่ยังไม่ได้เปิดออกสู่ surface mucosa จากลักษณะที่พบนี้ ใกล้เคียงกับความผิดปกติทาง histology ที่เรียกว่า hyperplasia รูปร่างของ crypt มีขนาดใหญ่และสั้นแต่ยังคงมีลักษณะที่เป็นร่อง crypt ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ ในบาง crypts จะพบว่ามีความผิดปกติ (รูปที่ 35C) นอกจากนี้ยังพบลักษณะของ crypt ที่มีลักษณะของการแตกหน่อ (branching) บริเวณที่ฐานของ crypt (รูปที่ 35D) ซึ่งลักษณะที่พบในรูป 35D นี้ จะพบเฉพาะในกลุ่มที่ 3 เท่านั้น

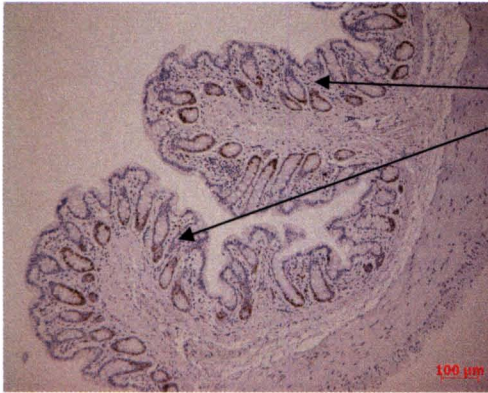
จากข้อมูลที่ได้นี้ แม้ว่าการนับจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่พบอยู่ใน crypt ของหนูกลุ่มนี้มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมหรือหนูปกติ แต่จากการวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างของ crypt ก็พบว่า มีความแตกต่างกัน ซึ่งจากที่กล่าวไว้ข้างต้น ว่าการนับจำนวน Ki67 positive cells เป็นการวิเคราะห์จาก crypt ที่ยังสมบูรณ์ ดังนั้น การวิเคราะห์ถึงลักษณะรูปร่างในภาพรวมของ crypt รวมทั้งลักษณะของผนังลำไส้ จึงมีความจำเป็นในการประเมินพยาธิสภาพของหนูกลุ่มต่างๆ

ส่วนลักษณะรูปร่างของ crypt ที่พบในหนูกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่กินชิริชินก่อนและหลังการได้รับสาร DMH (รูปที่ 36-37) ลักษณะการม้วนพับของ colonic mucosa ในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่กินชิริชิน แต่ที่น่าสังเกตคือ พบลักษณะรูปร่างของ crypt ที่มีรูปร่างเรียวยาว บาง crypt มีขนาดใหญ่แต่ยังคงมีความยาวที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 ที่กินเคซีนและได้รับสาร DMH พบ crypt ที่มีลักษณะของ hyperplasia ในหนูทั้ง 2 กลุ่ม แต่ไม่พบความผิดปกติของรูปร่าง crypt ที่มีลักษณะเป็น branching ในทั้งสองกลุ่มนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMH ทั้ง 3 กลุ่ม ในภาพรวมลักษณะของ crypt และผนังลำไส้ใหญ่ของหนูกลุ่มที่กินชิริชินมีความปกติมากกว่ากลุ่มที่กินเคซีนที่พบการเปลี่ยนแปลงหรือมีความผิดปกติที่ค่อนข้างรุนแรงกว่า



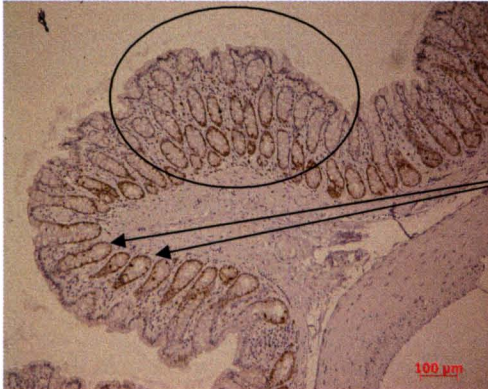
รูปที่ 34 ลักษณะรูปร่างของ crypt ปกติที่พบในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (A และ B แทน กลุ่ม 1 casein diet; C และ D แทน กลุ่ม 2 sericin diet)

A



รูปร่างของ colonic mucosa มีการพับ (fold) ที่ผิดปกติ

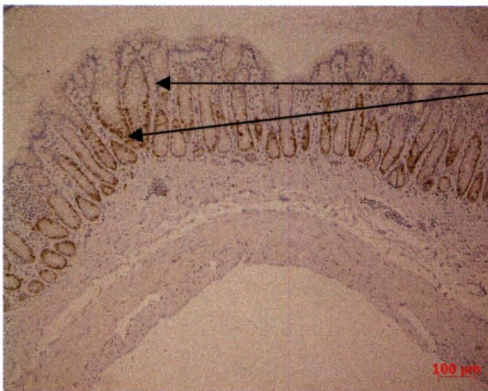
B



: บริเวณที่วงกลมมีกลุ่มของ ACF ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติ (hyperplasia)

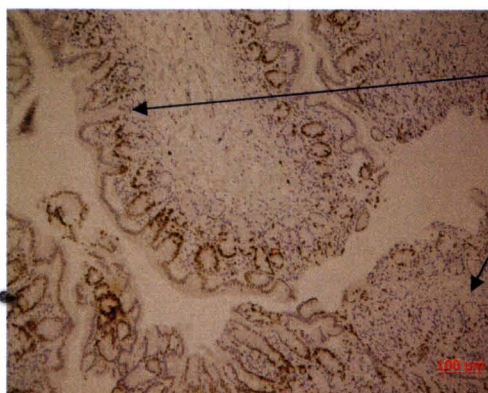
: ลักษณะของ crypts มีขนาดที่ค่อนข้างอ้วน

C



รูปร่างของ crypt ผิดปกติ และมีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ของเซลล์บริเวณฐานของ crypt

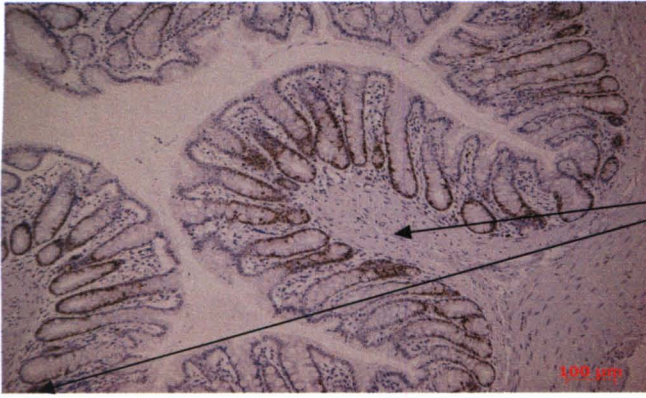
D



รูปร่างของ crypt ผิดปกติ บริเวณฐานของ crypt มีลักษณะคล้ายกับแตกหน่อ (branching) ออกเป็น 2 crypts

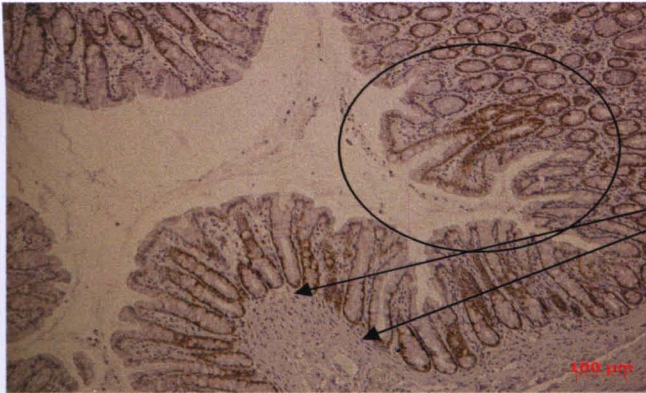
รูปที่ 35 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 3 กินอาหารที่มีเคซีนและได้รับสาร DMH

A



รูปร่างของ colonic mucosa มีการพับ (fold) ที่ค่อนข้างสม่ำเสมอคล้ายกับ กลุ่มควบคุมปกติ

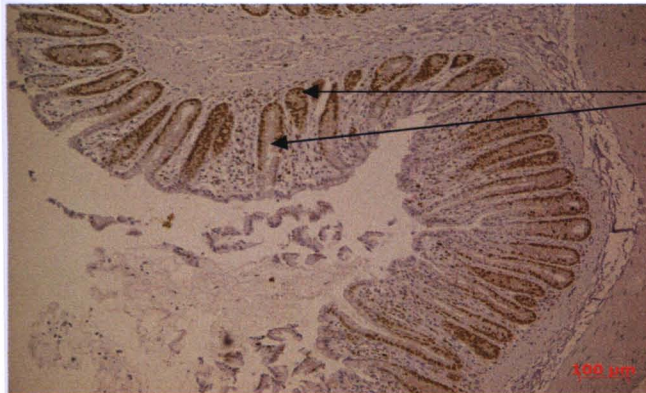
B



: บริเวณที่วงกลมมีกลุ่มของ ACF ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติ (hyperplasia)

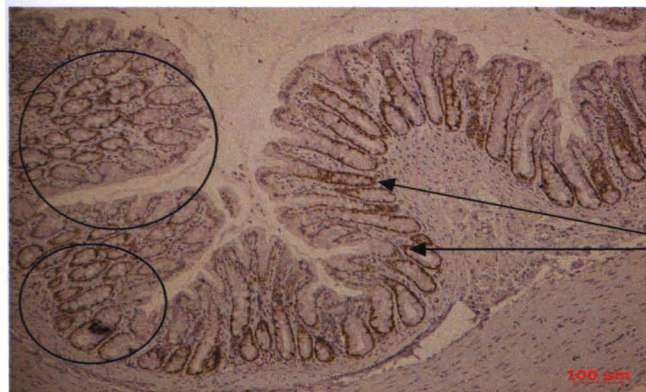
: ลักษณะของ crypts มีรูปร่างเรียวยาว และ

C



รูปร่างของ crypt เรียวยาวและมีการแสดงออกของโปรตีนKi67 ของเซลล์ตลอดความยาวของ crypt จากบริเวณฐานไปจนถึง surface mucosa

D

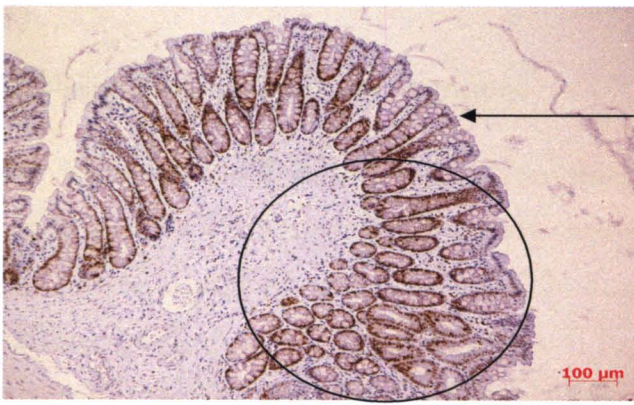


: บริเวณที่วงกลมมีกลุ่มของ ACF ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติ (hyperplasia)

: ลักษณะของ crypts มีรูปร่างเรียวยาว และ

รูปที่ 36 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 4 กินอาหารที่มีซิริซินก่อนได้รับสาร DMH

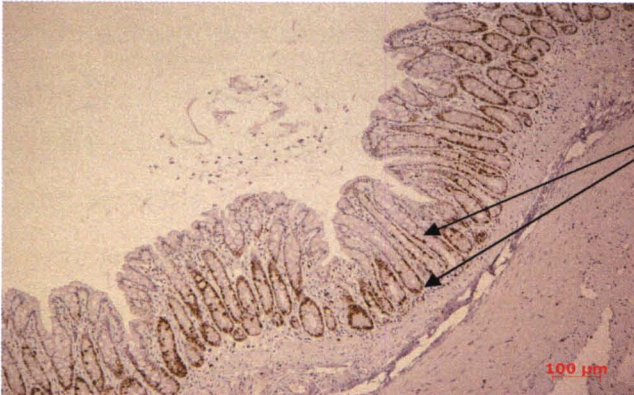
A



: รูปร่างของ colonic mucosa มีการพับ (fold) ที่ผิดปกติ มีขนาดที่ใหญ่ขึ้น

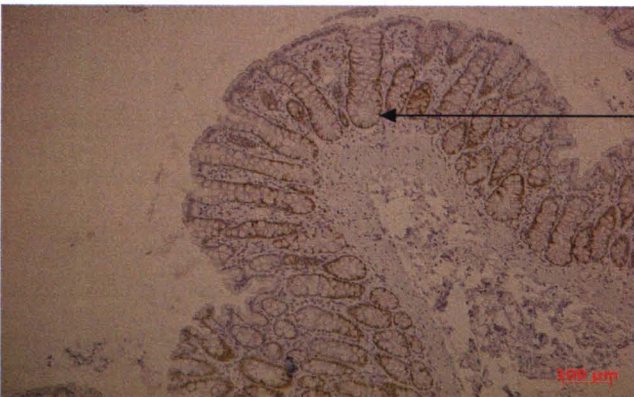
: บริเวณที่วงกลมมีกลุ่มของ ACF ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติ (hyperplasia)

B



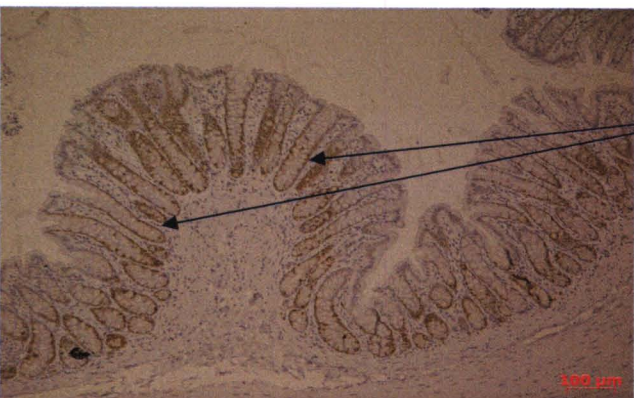
รูปร่างของ crypt เรียวยาวและมีการแสดงออกของโปรตีนKi67 ของเซลล์ตลอดความยาวของ crypt จากบริเวณฐานไปจนถึง surface mucosa

C



ลักษณะของ crypts มีขนาดที่ค่อนข้างอ้วนและขนาดค่อนข้างใหญ่

D



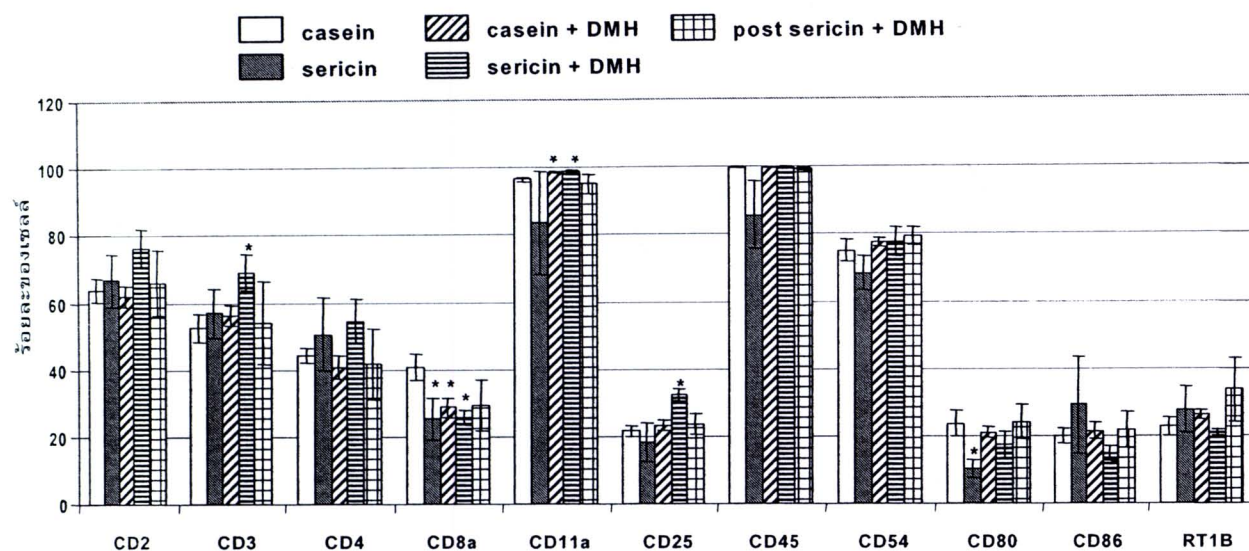
รูปร่างของ crypt เรียวยาวและมีการแสดงออกของโปรตีนKi67 ของเซลล์ตลอดความยาวของ crypt จากบริเวณฐานไปจนถึง surface mucosa

รูปที่ 37 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 5 กินอาหารที่มีซิริซินหลังการได้รับสาร DMH

14. ผลของซิริชินต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง

ในการศึกษาผลของซิริชินในการกระตุ้นระบบของภูมิคุ้มกัน ทำได้โดยการย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือดของหนูที่ทำการเจาะเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) ในวันที่ทำการุณยฆาต และนำไปย้อม surface maker ต่างๆ ที่เป็นตัวแทนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (รูปที่ 38) และสามารถแบ่งผลการทดลองเป็นในเชิงที่มีการกระตุ้นการทำงานที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า ในหนูทดลองที่กินอาหารที่มี 4% ซิริชินและได้รับ DMH 20 mg/kg มีการติด CD3 ซึ่งเป็น marker ของ T cell เฉลี่ยประมาณ 69.05% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ที่ย้อมติดเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนใน CD11a ซึ่งเป็น marker ของ adhesion molecule ที่ช่วยในการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด โดยจะย้อมติดทุกเซลล์ที่เป็นเม็ดเลือดขาว ที่พบในกลุ่มที่ได้รับ DMH และกินอาหารที่มี 4% casein และ 4% ซิริชิน (มีค่าเฉลี่ยประมาณ 98.32% และ 98.74% ตามลำดับ) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (96.37%) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และนอกจากนี้ยังพบว่า มีการติด CD25 ซึ่งย้อมติดใน T cell ที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% ซิริชิน (32.31%) ต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (23.18%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ส่วนในเชิงมีการกระตุ้นที่ลดลง ภายหลังการย้อม CD ต่างๆ พบว่า การติด CD8a ซึ่งเป็น marker ของ NK cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ช่วยในการกำจัดเซลล์มะเร็งในร่างกาย พบว่า หนูในกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein มีค่าเป็น 40.73% ซึ่งจะมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ ทั้งที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่จาก DMH และกลุ่มที่ได้รับซิริชิน โดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 25.25, 28.60 และ 25.72% ตามลำดับ และการติด CD80 ที่เป็น marker ของ monocyte, dendritic cell และ B cell มีค่า 10.28% ซึ่งน้อยกว่าในกลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% ซิริชิน โดยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (23.55%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 38 ผลของซีรีซินต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) จากเลือดของหนูทดลองหลังจากทำการเก็บเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) ของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง หลังระยะเวลา 5 เดือน ไปย้อมด้วย surface markers ชนิดต่างๆ ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD (* แสดงถึง $p\text{-value} \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1, ได้รับ casein)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ เพื่อให้การทดลองสามารถดำเนินไปตามแผนปฏิบัติการได้และสัตว์ทดลองสามารถมีชีวิตรอดจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง โดยสามารถกินอาหารและมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวเป็นไปตามปกติ จึงได้ทำการลดระยะเวลาในการทดลองเป็น 5 เดือน (จากที่วางแผนไว้ 6 เดือน) จากผลการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าหนูทุกตัวเกิดเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ 100% ที่ระยะเวลา 5 เดือน ซึ่งจากการสังเกตเบื้องต้นเกี่ยวกับน้ำหนักเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่า หนูที่ได้รับ DMH หรือกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้ง 3 กลุ่ม จะมีปริมาณการกินอาหารในเดือนที่ 5 ก่อนสิ้นสุดการทดลอง เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเหตุการณ์นี้ ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างแน่ชัดจนว่าเกิดจากสาเหตุใด อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากการกระบวนการดำเนินไปของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีผลรบกวนการดูดซึมสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นกับหนูทดลอง หนูกลุ่มดังกล่าวจึงต้องการอาหารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่เพื่อให้ได้ปริมาณอาหารที่เพียงพอ โดยน้ำหนักตัวไม่เพิ่มขึ้น

อัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เพิ่มมากขึ้นในพื้นที่แถบทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยเป็นผลมาจากพฤติกรรมการกินอาหารแบบชาวตะวันตกที่เพิ่มมากขึ้น (Khuhaprema and Srivatanakul, 2008) ดังนั้นการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในการรับประทานอาหารจึงเป็นสาเหตุหนึ่งจะช่วยในการป้องกันและลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Ponz de Leon, 2002; van Breda, et al., 2007) ดังนั้นอาหารจึงเป็นสาเหตุหลักที่มีผลต่อการป้องกันและลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งชนิดนี้ได้ จากผลการศึกษาการรับประทานอาหารเสริมในกลุ่มของโปรตีน wheat bran, soy bean, buckwheat และ whey protein ในสัตว์ทดลอง พบว่า อาหารเสริมที่ได้มาจากโปรตีนดังกล่าวสามารถช่วยในการลดความเสี่ยงและชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลองได้ (Compher, et al., 1999; Takahashi, et al., 1999; Hakkak, et al., 2001b, 2001a; Badger, et al., 2005) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนซิริซินซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถกินได้ และมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์ของโปรตีนซิริซินที่เพิ่มมากขึ้น จึงเชื่อว่าโปรตีนซิริซินน่าจะมีฤทธิ์ในการช่วยป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองที่ได้รับสาร DMH ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

จากการที่ซิริซินมีคุณสมบัติคล้ายกับอาหารในกลุ่มของโปรตีนเส้นใย สามารถย่อยได้ช้าและทนต่อภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ (Sasaki, et al., 2000) จึงทำให้โปรตีนซิริซินที่ไม่ถูกย่อยยังคงแสดงคุณสมบัติในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้ (Zhaorigetu, et al., 2007) ซิริซินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย polypeptides ที่มีความแตกต่างกัน มาประกอบกันจึงทำให้มีความหลากหลายในขนาดของโปรตีน คุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมี (Gamo, et al., 1977) รวมทั้งกระบวนการในการสกัดโปรตีนซิริซินก็มีผลต่อคุณสมบัติของโปรตีนเช่นกัน (Freddi, et al., 2003; Kurioka, et al., 2004) ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติทาง pharmacological properties ยกตัวอย่างเช่น ซิริซินที่มีขนาด 5 - 100 kDa มีผลในการกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนเซลล์ใน cell culture กว่าโปรตีนซิริซินที่มีขนาด 50-200 kDa (Tatsuta, et al.,

2005) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้โปรตีนซีรีซินที่มีขนาด 76 – 132 kDa ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า ซีรีซินมีผลต่อการลดจำนวนการเกิด ACF และช่วยชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

จากการศึกษานี้ พบว่า หนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับ DMH มีการเกิด ACF จำนวนมาก โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายซึ่งอยู่ติดกับส่วนของทวารหนัก (anus) และพบบ้างในลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง แต่ในลำไส้ใหญ่ส่วนต้นไม่พบการเกิดของ ACF ยกเว้นกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ DMH และกินอาหารควบคุมที่มี casein เป็นองค์ประกอบ ที่พบ ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ซึ่งอาจแสดงถึงการลุกลามของรอยโรคที่เกิดขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับซีรีซิน จากการที่พบ ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนปลายมากกว่าส่วนอื่นๆ นั้น อาจเป็นผลมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงของสาร DMH ในร่างกาย โดยเมื่อ DMH เข้าสู่ร่างกาย จะถูก metabolite ที่ตับเพื่อเปลี่ยนเป็นสาร AOM (azoxymethane) และกำจัดออกทางน้ำดี (bile acid) ซึ่งน้ำดีเหล่านี้จะถูกปล่อยออกสู่ลำไส้เล็กและผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ที่ลำไส้ใหญ่ก็จะเปลี่ยนสารนี้เป็นสารก่อมะเร็งที่ได้ (Tanaka, et al., 2009) เนื่องจากแบคทีเรียนั้นมักจะพบอยู่มากในส่วนปลายของลำไส้ใหญ่ จึงทำให้อัตราการเกิด ACF ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายสูงกว่าในลำไส้ใหญ่ส่วนอื่นๆ และทำให้สาร DMH เป็นที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง

โดยปกติแล้วการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่มีหลายขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลง (multi-step process) โดยมีการเปลี่ยนแปลงจากระยะเริ่มต้น (initiation) ของการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่สามารถสังเกตได้จากการเกิด ACF ที่ผนังของลำไส้ใหญ่ มาเป็นก้อนเนื้องอก (adenoma) ที่พร้อมจะเปลี่ยนแปลงเป็นก้อนมะเร็ง (adenocarcinoma) ในลำไส้ใหญ่ (Janne and Mayer, 2000) ในการทดลอง พบว่ากลุ่มที่ 3 ที่กินอาหารที่มี casein เป็นองค์ประกอบ ACF มีการพัฒนาจนเกิดเป็นก้อนเนื้องอกในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองจำนวน 2 ตัว ซึ่งแสดงถึงการดำเนินไปของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (progression) ของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ในขณะที่หนูกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่ได้รับอาหารที่มีซีรีซินไม่พบเหตุการณ์ดังกล่าวนี้ จากการที่หนูกลุ่มที่ได้รับซีรีซิน ไม่พบ ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น และไม่พบลักษณะของการพัฒนาเป็นก้อนเนื้อ อาจเป็นผลเนื่องมาจากซีรีซินมีฤทธิ์ชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

ในการวิเคราะห์จำนวนของ ACF ที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าจำนวน ACF ของหนูกลุ่มที่ได้รับซีรีซิน (กลุ่ม 4 และ 5) มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากมีความแปรปรวนในแต่ละกลุ่มสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดมะเร็งมีความเฉพาะตัว ไม่อาจคาดการณ์ให้หนูแต่ละตัวเกิดมะเร็งในอัตราที่มีความรุนแรงที่เท่าๆกันได้ แม้จะใช้สาร DMH ในขนาดที่เท่ากัน จึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในหนูทดลอง

นอกจากจำนวน ACF แล้ว การประเมินความรุนแรงของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ อาจทำได้โดยการวิเคราะห์ขนาดของ ACF ที่เกิดขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ ขนาดของ ACF ถูกแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ขึ้นกับจำนวนของ crypt ที่พบในแต่ละ ACF โดยแบ่งเป็น 1, 2, 3, 4 และ ≥ 5 crypt/ACF ซึ่งถ้าพบ ACF ที่มีขนาดใหญ่ในสัดส่วนที่มากกว่า ก็แสดงถึงความรุนแรงหรือการดำเนินไปของโรคมะเร็งมากกว่า จากการทดลองนี้ ซีรีซินไม่มีผลเปลี่ยนแปลง ACF ขนาดเล็ก (1-4 crypt/ACF) แต่มีแนวโน้มที่จะลดจำนวนของ

ACF ขนาดใหญ่ที่มี ≥ 5 crypt/ACF แม้ข้อมูลจะมีความแปรปรวนสูง แต่ก็แสดงให้เห็นว่าซิริชินอาจมีผลในการชะลอการดำเนินไปของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

เนื่องจาก ACF ขนาดใหญ่ (ที่มี ≥ 5 crypt/ACF) นี้ยังมีความแตกต่างกัน เนื่องมาจากปริมาณ crypt ภายใน ACF ที่อาจมีอยู่ระหว่าง 5-10 crypt/ACF หรือมากกว่าซึ่งยากต่อการนับให้ได้ค่าที่ถูกต้อง ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ ACF กลุ่มนี้เพิ่มเติม โดยการวัดพื้นที่ของแต่ละ ACF ซึ่งผลการทดลอง พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับซิริชิน (กลุ่ม 4) มีพื้นที่ของ ACF ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่ม 3) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ อาจกล่าวได้ว่า การได้รับอาหารที่มีซิริชินน่าจะมีผลในการชะลอความก้าวหน้าหรือการดำเนินไปของเกิดเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้เคยรายงานถึงฤทธิ์ของซิริชินในการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้งในหนู rat และ mice (Zhaorigetu, et al., 2001) โดยการทดลองในหนู mice ใช้หนูเป็นจำนวนมาก กลุ่มละ 40 ตัว และอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่คิดเป็น 37.5 % ซึ่งซิริชินสามารถลดอัตราการเกิดลงเหลือ 12.5% และหนูกลุ่มนี้มีความรุนแรงที่ต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับซิริชิน (Zhaorigetu, et al., 2001) ส่วนการทดลองในหนู rat ทำการฉีด DMH ครั้งเดียวและระยะเวลาทดลอง 28 วัน ซึ่งพบว่าซิริชินสามารถลดจำนวนของ ACF ได้ 36% (Zhaorigetu, et al., 2001) แม้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย DMH จะมีความแตกต่างกัน ทั้งระยะเวลาและขนาดของ DMH ที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งจำนวน/ชนิดของสัตว์ทดลองที่ใช้ จึงอาจทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันบ้าง ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ ยังได้ทำการวิเคราะห์ในรายละเอียดเพิ่มเติม ทั้งขนาดและการกระจายตัวเพื่อประเมินความรุนแรงในการดำเนินไปของโรค แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น คือ ซิริชินสามารถลดความรุนแรงหรือการดำเนินไปของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

ส่วนกลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือชะลอการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ของซิริชิน ยังไม่มีหลักฐานชัดเจน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของซิริชินที่มีความเป็น anti-oxidant นอกจากนี้ยังพบว่าซิริชินเป็นโปรตีนที่สามารถต้านการทำงานของ protease ในลำไส้ใหญ่ได้ (Sasaki, et al., 2000) จึงอาจจะถูกละลายได้ช้ากว่าโปรตีนอื่นๆ ซึ่งเป็นผลดีต่อลำไส้ใหญ่ ในแง่ที่ช่วยป้องกันการสัมผัสของสารพิษกับผนังของลำไส้ใหญ่ได้โดยตรง หรืออาจจะช่วยในด้านของการกระตุ้นให้มีการกำจัดสารพิษออกไปทางอุจจาระเช่นเดียวกับกรณีของสารอาหารที่เป็นเส้นใยอื่นๆ (Hakkak, et al., 2001a; Liu, et al., 2001; Belobrajdic, et al., 2003) จึงทำให้มีการตกค้างของสารพิษในส่วน of ลำไส้ใหญ่น้อยลง สำหรับการทดลองนี้ ได้ทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของซิริชิน โดยประเมินการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ และเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis ซึ่งเซลล์มะเร็งโดยทั่วไปจะเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถแบ่งตัวได้ดีและไม่เกิดการตายแบบ apoptosis เหมือนกับเซลล์ปกติ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์เซลล์ของผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองด้วย immunohistochemistry ด้วยการวัด Ki67 และ Bcl-2 ซึ่งเป็น protein marker ของเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ (proliferative cells) และ anti-apoptotic cells ตามลำดับ

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Ki67 ภายใน crypt ที่ผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทุกกลุ่มมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 จะหนาแน่นมากที่ฐานของ crypt และมีจำนวนลดลงตามระยะทางจากฐาน crypt จนถึงส่วนบนของ crypt ซึ่งหนูที่ได้รับ DMH และกินอาหารเคซีน พบว่าการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ไม่แตกต่างจากหนูปกติ รวมทั้งขนาดความยาวของ crypt ก็ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของ crypt และผนังลำไส้ใหญ่ จะพบว่ามี ความผิดปกติ โดยพบลักษณะของ crypt ที่มีขนาดใหญ่และสั้น รูปร่างบิด ไม่เป็นร่องที่สมบูรณ์ และลักษณะของ crypt cells ผิดปกติ มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และพบลักษณะของ hyperplastic crypt นอกจากนี้ยังพบลักษณะของ dysplastic crypts หรือ crypt ที่มีรูปร่างผิดปกติ

เนื่องจากข้อมูลของกระบวนการเกิด colonic tumorigenesis ส่วนใหญ่ที่มีรายงานไว้ เป็นข้อมูลที่ได้จากคน ดังนั้นในที่นี้จึงจะวิจารณ์ผลการวิเคราะห์ โดยอาศัยจากข้อมูลของคน ซึ่งคาดว่าจะคล้ายกับที่เกิดขึ้นในหนูทดลอง ในกระบวนการของ tumorigenesis ระยะ hyperplasia เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนขึ้นมาก โดย hyperplastic crypt จะมีขนาดใหญ่และยาวกว่า normal crypt แต่ไม่พบลักษณะของ dysplasia (Cheng and Lai, 2003) จากการดำเนินไปของโรคระยะ hyperplasia อาจมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นระยะของ dysplasia ที่เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนเซลล์อาจลดลง crypt จะมีลักษณะที่ผิดปกติไป (Bouzourene, et al., 1999; Cheng and Lai, 2003) ซึ่งจากการวิเคราะห์ลักษณะของ crypt ในหนูกลุ่มที่ได้รับ DMH และกินอาหารที่มีชิริชิน crypt พบว่าที่ผนังลำไส้ ไม่พบลักษณะของ dysplastic crypt แต่ยังพบลักษณะของ hyperplasia นอกจากนี้ ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 รวมทั้งความยาวของ crypt ก็มากกว่ากลุ่มที่กินเคซีน และหนูที่กินชิริชินไม่พบ dysplastic crypt ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิด tumorigenesis นี้ อยู่ในระยะของ hyperplasia หรือการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นส่วนใหญ่ จึงอาจเป็นไปได้ที่กระบวนการ tumorigenesis ของหนูกลุ่มนี้อยู่ในระยะต้นกว่ากลุ่มที่กินเคซีน หรืออาจกล่าวได้ว่ากระบวนการ tumorigenesis ในหนูที่กินชิริชินดำเนินไปได้ช้ากว่า นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ในเลือดที่บ่งบอกถึงการทำการของตับและไตของหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่กินชิริชินแม้จะได้รับ DMH และมีการพบ ACF ซึ่งเป็นสัญญาณของการเริ่มต้น tumorigenesis แต่การทำงานของตับและไตมีค่าใกล้เคียงกว่าปกติมากกว่าหนูที่กินเคซีน

ในการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้เพิ่มการทดลองในส่วนที่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับระบบของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น เพื่อที่จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของชิริชินในแง่ที่เป็นการกระตุ้นระบบของภูมิคุ้มกันเมื่อมีการเกิดเซลล์มะเร็งขึ้นในร่างกายได้ ซึ่งจากผลการทดลองที่พบนั้นจะเห็นได้ว่า มีการทำงานของ T cell และ T cell ที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น จากการที่ย้อมติด CD3 และ CD25 เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กินอาหารที่มีชิริชิน ดังเช่นการที่สังเกตพบว่าขนาดของ ACF ลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับ DMH และกินอาหารที่มีชิริชิน ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าชิริชินอาจจะมีผลในการกระตุ้นการทำงานของ T cell ในสถานะที่มีการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ขึ้น และอาจส่งผลในการชะลอความรุนแรงของโรคได้ แต่อย่างไรก็ตาม NK cell ที่ทำหน้าที่หลักในการกำจัดเซลล์มะเร็งพบว่าในหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีชิริชินทั้งกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีจำนวนของ NK cell ที่ลดน้อยลง



โดยสรุป ผลการศึกษาและวิเคราะห์จากโครงการวิจัยนี้ พบว่า ชิริชินมีฤทธิ์ในการชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยฤทธิ์นี้พบได้จากการกินชิริชินทั้งก่อนและหลังจากได้รับสารก่อมะเร็ง ซึ่งการรับประทานอาหารที่มีชิริชิน มีแนวโน้มที่จะช่วยชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ในช่วงระยะแรกของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (initiation and promotion stage) ดังนั้น ชิริชินจึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมที่มีส่วนช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้